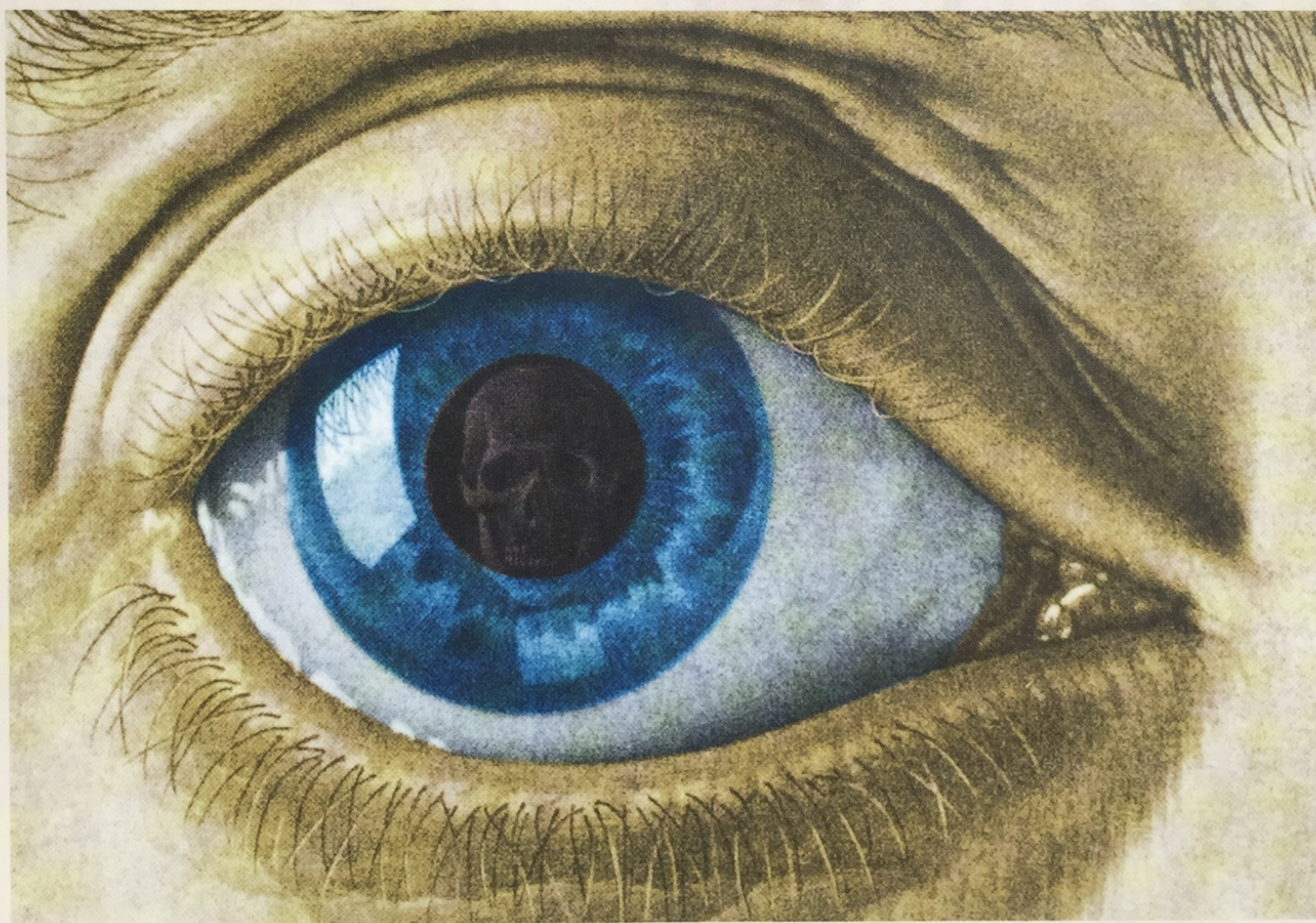


Б.А. Руденко
А.Е. Коваленко
К.А. Галузин
Г.И. Руденко
Д.А. Кардонский
Д.А. Гришин
А.А. Еганов

ХИМИКО- АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАРКОТИЧЕСКИХ И ДОПИНГОВЫХ СРЕДСТВ



ИЗДАТЕЛЬСКИЙ ДОМ
нарконет
РОССИЯ БЕЗ НАРКОТИКОВ

У Ч Е Б Н О Е П О С О Б И Е

Руденко Б.А., Коваленко А.Е., Галузин К.А.,
Руденко Г.И., Кардонский Д.А., Гришин Д.А., Еганов А.А.

Химико-аналитическое определение наркотических и допинговых средств

Учебное пособие

Москва
«Нарконет»
2007

УДК 615
ББК 52.84
Х46

Авторы:

Руденко Б.А., Коваленко А.Е., Галузин К.А., Руденко Г.И., Кардонский Д.А., Гришин Д.А., Еганов А.А.

Рецензенты:

Авраменко Г.В. – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой технологии химико-фармацевтических и косметических средств Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева.

Пиголкин Ю.И. – доктор медицинских наук, профессор, чл.-корр. РАМН, заведующий кафедрой судебной медицины Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова.

Романов Б.К. – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии фармацевтического факультета Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова.

Х 46 Химико-аналитическое определение наркотиков и допинговых средств / Руденко Б.А., Коваленко А.Е., Галузин К.А., Руденко Г.И., Кардонский Д.А., Гришин Д.А., Еганов А.А. – М.: Издательский дом «Нарконет», 2007. – 368 с.

ISBN – 978-5-94497-028-2

В книге изложены основные химико-аналитические методы, используемые в настоящее время при проведении судебно-медицинских экспертиз для обнаружения наркотиков и иных психотропных и допинговых средств как в сырье и готовых препаратах, так и в биологических объектах, к которым относятся выделения обследуемого организма (моча, кал, слюна), кожа и ее придатки (волосы, ногти, и др.), а также кровь, лимфа и органы. Изложению конкретных примеров каждого из рассмотренных методов предпослано достаточно подробное описание его теоретических и практических основ. Это, по нашему мнению, создает основу для дальнейшего совершенствования этих методов, в том числе и усилиями тех читателей, которые будут увлечены широтой и многообразием возможностей, предоставляемых современными химико-аналитическими методами.

Книга будет интересна для специалистов химико-токсикологического и судебно-медицинского анализа, врачей-наркологов, студентов медицинских вузов и других специалистов соответствующего профиля.

Допущено учебно-методическим объединением по образованию в области химической технологии и биотехнологии в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Химическая технология синтетических биологически активных веществ»

УДК 615
ББК 52.84

Право на данное издание принадлежит ООО «Издательский дом «Нарконет».
Воспроизведение и распространение в каком бы то ни было виде части или целого издания не могут быть осуществлены без письменного разрешения Издательского дома «Нарконет».

ISBN 978-5-94497-028-2

© Издательский дом «Нарконет», 2007
© Руденко Б.А., Коваленко А.Е., Галузин К.А.,
Руденко Г.И., Кардонский Д.А., Гришин Д.А., Еганов А.А., 2007

Авторы

Руденко Борис Антонович – доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией сорбционных методов Института геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН.

Научные интересы: органическая химия, экология, хроматография и ее высокоэффективные варианты (капиллярная, циркуляционная, ионная). Автор более 300 научных работ. Имеет 20 авторских свидетельств на изобретения и шесть отечественных и зарубежных патентов. Профессор Б.А. Руденко участвовал в ряде экологических экспедиций на исследовательских судах и самолетах, включая 25-ю Советскую антарктическую экспедицию.

Коваленко Алексей Евгеньевич – кандидат технических наук, заведующий химико-аналитической лабораторией НИИ Молекулярной медицины Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова. Специалист в области физико-химических методов анализа сверхмалых концентраций лекарственных средств, наркотических веществ, технологических примесей, изотопов в различных средах. Автор более 60 научных статей и авторских свидетельств на изобретения.

Галузин Константин Анатольевич – генеральный директор лечебно-диагностического центра «Новейшие Медицинские Технологии».

Руденко Галина Ивановна – кандидат технических наук, известный специалист в области хроматографического анализа следовых количеств органических примесей в воздушной среде. Научные интересы: хроматографический анализ микроконцентраций веществ в различных средах. Автор более 30 научных статей и авторских свидетельств на изобретения.

Кардонский Дмитрий Александрович – научный сотрудник химико-аналитической лаборатории НИИ Молекулярной медицины Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова. Специалист в области физико-химических методов анализа лекарственных средств, наркотических веществ, пестицидов, отравляющих веществ. Соавтор более десяти научных публикаций.

Гришин Денис Александрович – научный сотрудник химико-аналитической лаборатории НИИ Молекулярной медицины Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова. Специалист в области физико-химических методов анализа (включая LC/MS/MS) лекарственных средств, наркотических веществ. Соавтор более десяти научных публикаций.

Еганов Александр Анатольевич – научный сотрудник химико-аналитической лаборатории НИИ Молекулярной медицины Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова. Специалист в области физико-химических методов анализа лекарственных средств, наркотических веществ, гетероциклических соединений. Соавтор более десяти научных публикаций.

Введение

Предлагаемое вниманию читателей пособие содержит материалы лекций, прочитанных авторами на курсах повышения квалификации специалистов в области химического, химико-токсикологического и судебно-химического анализа. В работе использованы материалы, издаваемые международными и национальными организациями, чья сфера деятельности – контроль и анализ наркотических средств, а также данные оригинальных статей, опубликованных в последнее время в соответствующих зарубежных журналах: *Journal of Analytical Toxicology*, *Journal of the Forensic Science*, *Journal of the Chromatography* и других. Вместе с тем авторы не ставили задачу дать полный обзор литературы, а лишь по возможности всесторонне охватить существующие направления исследований и дать наиболее широкое представление о свойствах распространенных наркотических веществ. По этой же причине информация о их действии на организм человека приводится в виде простого перечня симптомов. Авторы надеются, что данное пособие может представлять интерес для химиков, химиков-токсикологов, врачей-наркологов, работников судебно-медицинских экспертиз и других специалистов, в той или иной степени заинтересованных в информации о поведении наркотических средств в организме, а также для студентов химических и медицинских вузов и училищ, специализирующихся в данной области.

Глава 10 «Определение изотопного состава наркотических средств» написана крупнейшими специалистами нашей страны в этой области академиком Э.М. Галимовым и старшим научным сотрудником В.С. Севастьяновым.

В отличие от других подобных изданий в пособии приведено большое количество информационного материала. Некоторые расхождения приводимых данных вполне объяснимы, если учесть, что они получены в разных лабораториях, разными методами и при различных условиях.

Все замечания по содержанию книги будут приняты авторами с благодарностью.

Профессор Б.А. Руденко

Содержание

Введение	4
Глава 1. Задачи химико-аналитического определения наркотических и допинговых средств	8
Глава 2. Основные группы контролируемых веществ.....	13
2.1. Опиаты	14
2.2. Каннабиноиды	19
2.3. Кокаин	20
2.4. Фенилалкиламины	23
2.5. Производные амфетамина	29
2.6. Производные барбитуровой кислоты	32
2.7. Производные 1,4-бензодиаземина	32
2.8. Производные фенотиазина	34
2.9. Галлюциногены	34
2.10. Фенциклидин и его аналоги	36
2.11. Фентанил и его аналоги	37
2.12. Метадон, трамадол, метаквалон	39
2.13. Второстепенные психодепрессанты и психостимуляторы	41
2.14. Вещества, связанные с токсикоманией	42
2.15. Допинговые средства	42
Глава 3. Характеристика основных объектов химико-аналитического анализа для выявления наличия соединений, подлежащих контролю.....	50
Глава 4. Предварительные методы определения наркотических веществ	56
4.1. Опий (морфин, героин, кодеин)	57
4.2. Каннабиноиды (гашиш)	58
4.3. Кокаин	58
4.4. Барбитураты	59
4.5. Вещества группы амфетамина	60
4.6. Обнаружение фенциклидина и метаквалона	60
4.7. Метадон	60
4.8. Производные 1,4-бензодиаземина	60
Глава 5. Спектральный анализ наркотических, лекарственных и допинговых веществ	63
5.1. Введение	63
5.2. Спектроскопическое определение барбитуратов	64
5.3. Спектральные характеристики 1,4-бензодиазепинов и продуктов их разложения – замещенных бензофенонов	66
5.4. Спектральные характеристики каннабиноидов	70
5.5. Спектральные характеристики кокаина и сопутствующих соединений	70
5.6. Спектральный анализ опиатов	70
5.7. Спектральные характеристики фенилалкиламинов	72
5.8. Спектральные характеристики производных фенотиазина	74

Глава 6. Хроматографические методы определения наркотических и допинговых веществ. Высокоэффективная жидкостная хроматография	81
6.1. Введение	81
6.2. Степень разделения пиков, коэффициент разделения, число теоретических тарелок	83
6.3. Зависимость эффективности разделения от параметров процесса хроматографии	86
6.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография	93
6.5. Адсорбционная жидкостная хроматография	97
6.6. Распределительная хроматография	99
6.7. Ионная хроматография	107
6.8. Подвижные фазы в высокоэффективной жидкостной хроматографии	114
6.9. Выражение параметров удерживания в хроматографии	118
Глава 7. Практические аспекты высокоэффективной жидкостной хроматографии	127
7.1. О колонках для ВЭЖХ	127
7.2. Оценка качества колонок для ВЭЖХ	128
7.3. Аппаратура для высокоэффективной жидкостной хроматографии	129
7.4. Количественные измерения в хроматографии	146
7.5. Расчет площадей хроматографических пиков при их неполном разделении	151
7.6. Расчет состава смесей по хроматограммам	153
7.6.1. Метод внутренней нормализации	153
7.6.2. Метод абсолютной градуировки	155
7.6.3. Метод внутреннего стандарта	156
Глава 8. Тонкослойная хроматография в анализе наркотических и допинговых средств	161
8.1. Подготовка сорбентов и приготовление тонкослойных хроматографических пластинок	166
8.2. Техника нанесения проб	167
8.3. Усовершенствованные способы подвода элюента	170
8.4. Качественный анализ с помощью планарной хроматографии	178
8.5. Способы количественной обработки тонкослойных хроматограмм	182
8.6. Метод тонкослойной хроматографии в анализе наркотических и допинговых средств	184
8.7. Алкалоиды мака снотворного и синтетические опиаты	184
8.8. Каннабиноиды	187
8.9. Алкалоиды спорыньи	188
8.10. Алкалоиды из листьев коки	189
8.11. Грибы, содержащие псилоцин и/или псилоцибин	189
8.12. Тонкослойная хроматография наркотических и других сильнодействующих веществ медицинского назначения, изготовленных незаконно	190
8.13. Барбитураты	190
8.14. Производные 1,4-бензодиазепина	191

Глава 9. Газовая хроматография наркотиков и допинговых средств. Хромато-масс-спектрометрическое определение наркотиков и допинговых средств.....	197
9.1. Введение	197
9.2. Техника выполнения анализов	198
9.2.1 Хроматографические колонки.....	201
9.3. Принципы работы основных типов детектирующих систем в газовой хроматографии и методы расчета поправочных коэффициентов.....	204
9.3.1. Детектор по теплопроводности.....	204
9.3.2. Ионизационные детекторы.....	207
9.3.3. Пламенно-ионизационный детектор	209
9.3.4. Термоионный детектор	210
9.3.5. Электроннозахватный детектор	211
9.3.6. Микрокондуктометрический детектор.....	211
9.3.7. Сочетание капиллярной газовой хроматографии с масс-спектрометрией	216
Глава 10. Капиллярный электрофорез	230
10.1. Принципы капиллярного электрофореза.....	232
10.2. Эффективность разделения в капиллярном электрофорезе.	242
10.3. Факторы, влияющие на достигаемое разделение.....	245
10.3.1. Диффузия	245
10.3.2. Адсорбция	247
10.3.3. Электрофоретическая дисперсия.....	248
10.3.4. Влияние начальной ширины зоны вводимой пробы.	250
10.3.5. Джоулево тепло.....	254
10.4. Капилляры	256
10.5. Методы электрохроматографии	258
10.5.1. Электрохроматография.....	259
10.5.2. Мицеллярная электрокинетическая хроматография.....	260
10.5.3. Капиллярный гель-электрофорез	262
10.6. Примеры применения метода капиллярного электрофореза.....	263
Глава 11. Определение изотопного состава наркотических средств	272
Приложение 1. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 27 января 2006 г. № 40 «Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ»	281
Приложение 2. Методика обнаружения и количественного определения опиатов и их синтетических аналогов, производных фенилалкиламинов, кокаина, кетамина в моче методом газовой хроматографии масс-селективным детектированием	317
Приложение 3. Лабораторная диагностика острых химических отравлений пособие для врачей.....	337

ГЛАВА 1

ЗАДАЧИ ХИМИКО-АНАЛИТИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАРКОТИЧЕСКИХ И ДОПИНГОВЫХ СРЕДСТВ

Одной из негативных последствий развития человеческой цивилизации в XXI веке является все более широкое и повсеместное распространение наркотических средств во всем мире. **Наркотическими средствами** (наркотиками) принято называть такие вещества, которые при введении в организм человека вызывают ощущение физического или психического комфорта, удовольствия, либо позволяют уменьшить неприятные ощущения, вызываемые теми или иными факторами.

Кроме наркотиков, приобретает угрожающие масштабы использование в тех или иных целях достаточно широкого круга веществ, применяемых в качестве лекарств в медицине или используемых для технических целей. Такие пристрастия принято обозначать терминами «**лекарственная зависимость**» и «**токсикомания**». В общем, наркотики и вещества двух последних групп относят к группе химических агентов «одурманивающего» действия, или, иначе говоря, к группе «одурманивающих средств».

Злоупотребление такими средствами, как правило, наносит весьма значительный прямой вред здоровью людей, причиняет серьезный ущерб экономике, разрушает нравственные основы общества. Эти последствия становятся еще более угрожающими вследствие распространения ВИЧ-инфекции из-за антисанитарного внутривенного введения наркотиков. Матери, пристрастившиеся к систематическому употреблению наркотиков и других одурманивающих веществ, как правило, производят на свет детей с серьезными физическими и умственными недостатками, что создает серьезную прямую угрозу генофонду человечества.

Угрозы благополучию общества, связанные с распространением наркотических и других одурманивающих средств, столь велики, что побудили целый ряд стран и саму Организацию Объединенных Наций принять целый ряд законодательных положений, ограничивающих или полностью запрещающих любое применение таких веществ, иначе как в сугубо медицинских целях. Среди таких законодательных положений можно указать Конвенцию ООН о борьбе с незаконным оборотом наркотических средств и психотропных веществ от 19 декабря 1988 г., заменившую аналогичные соглашения, принятые в 1961-м и в 1971 гг., а также Резолюцию Генеральной Ассамблеи ООН от 15 апреля 1990 г. по проблемам международного сотрудничества в борьбе с незаконным оборотом и распространением наркотических и психотропных средств.

Эти документы рекомендуют странам – участницам Конвенции ввести строгий контроль за производством, изготовлением, склонением к употреблению, предложением к продаже, распространением, поставкой, переправкой и экспортом любого наркотичес-

кого вещества (или средства). Документы ООН запрещают культивирование целого ряда растений, являющихся сырьем для получения наркотических средств (опийного мака, кокаинового куста, конопли и др.), равно как и изготовление, транспортировку, распространение и продажу оборудования и полупродуктов для производства наркотических средств.

В России принят ряд законоположений, устанавливающих ответственность за правонарушения, связанные с оборотом наркотических средств. Такие законоположения содержатся в Уголовном Кодексе РФ, в Кодексе об административных правонарушениях, в Гражданском Кодексе, Жилищном Кодексе и в Кодексе законов о браке и семье. Изложенные обстоятельства вызывают настоятельную необходимость в разработке и применении надежных и достаточно чувствительных химико-аналитических методов, позволяющих обнаруживать и количественно определять самые малые концентрации наркотических и других одурманивающих (психотропных) средств как в исходном сырье для их изготовления и в готовых к употреблению наркотиках, так и в биологических объектах, отобранных у лиц, подозреваемых в употреблении таких средств, либо изъятых в процессе судебно-химических исследований.

Сходные химико-аналитические проблемы возникают при контроле допинговых средств, используемых спортсменами с целью получения известных преимуществ перед конкурентами на спортивных соревнованиях.

Незаконное применение различных допинговых средств спортсменами известно уже более 30–40 лет. К числу запрещенных средств такого рода относятся стимуляторы нервной системы, некоторые наркотики, анаболические агенты (чаще всего стероидного характера), диуретики, пептиды, гликопротеиновые гормоны и их аналоги. Запрещается применение веществ, относящихся к запрещенным группам, даже если это конкретное вещество не указано в соответствующем списке. Кроме того, запрещены любые химические и физические манипуляции, которые могут изменить состав биологических проб, отбираемых для контроля допинговых средств (чаще всего проб мочи).

Хотя истинный масштаб употребления допинговых средств неизвестен, по оценке Международного Олимпийского комитета, в 1995 г. было выявлено около 1,6% проб, содержащих допинговые средства, из более чем 9 тысяч проб, проанализированных в 24 лабораториях, аккредитованных МОК.

Химико-аналитическое определение допинговых средств в биологических пробах порождает проблемы, сходные с теми, которые возникают при анализе наркотических средств, что оправдывает рассмотрение этих двух проблем в одной книге.

К числу наиболее распространенных средств такого рода относятся табак и алкоголь, которые находят в настоящее время поистине массовое употребление. К сожалению, кроме этих двух средств, в настоящее время приобрели широкое распространение многочисленные иные химические агенты, в ряде случаев обладающие во много раз более сильным отрицательным действием на организм употребляющих их людей.

Средства, оказывающие воздействие на психику употребляющих их лиц, подразделяются на две большие категории: наркотические средства (наркотики) и средства, вызывающие токсикоманию, включая лекарственную зависимость.

Наименование «наркотическое средство», «наркотик» применяется по отношению к таким препаратам, которые могут быть охарактеризованы тремя признаками: медицинским, социальным и юридическим. С медицинской точки зрения наркотическое вещество оказывает определенное воздействие на центральную нервную систему употребляющих

его лиц, обычно вызывающее ощущение удовольствия, удовлетворения. Это свойство наркотических средств, как правило, вызывает эффект привыкания, пристрастия к данному веществу, что порождает потребность и стремление к периодическому употреблению таких веществ – к возникновению зависимости человека от них, т.е. к развитию наркомании или токсикомании [1, 2].

С другой стороны, понятие наркотика включает в себя социальную составляющую, проявляющуюся в тех случаях, к сожалению, все более частых в XXI веке, когда немедицинское употребление данного вещества приобретает массовый характер среди населения или среди его отдельных социальных групп (учащихся, студентов, интеллигенции и др.).

Наконец, в тех случаях, когда данное вещество включено в число наркотических средств законодательными органами или организациями здравоохранения данной страны, возникает юридическая составляющая понятия «наркотик».

При отсутствии хотя бы одной из указанных составляющих вещество, способное воздействовать на центральную нервную систему, рассматривается как средство, вызывающее токсикоманию или лекарственную зависимость.

И наркотики, и средства, вызывающие токсикоманию, при регулярном употреблении вызывают развитие психологической либо физической зависимости, либо того и другого. Психологическая зависимость проявляется в чувстве удовлетворения или удовольствия при приеме таких средств, что порождает стремление к регулярному их приему.

Физическая зависимость проявляется в значительных физических расстройствах (обобщенно называемых **синдромом абстиненции**) при прекращении или при задержке приема наркотика. Такие расстройства могут включать боли в суставах, психические расстройства и др. Вследствие наличия таких расстройств наркомания и токсикомания с медицинской точки зрения рассматриваются как болезненные состояния, требующие медицинского вмешательства и лечения.

Допинговые средства включают целый ряд препаратов, принимаемых спортсменами для того, чтобы получить определенные преимущества на спортивных соревнованиях. К ним относятся химические и биологические агенты, способствующие увеличению мышечной массы, повышению скорости движений, снижению веса, усилению морально-волевых качеств спортсмена [3].

Хотя употребление допинговых средств охватывает неизмеримо более узкую группу людей, выявление их использования, особенно при крупных спортивных соревнованиях типа Олимпийских игр, имеет достаточно существенную социальную значимость и вызывает большой общественный интерес.

В то же время с точки зрения химико-аналитического определения допинговые средства, наркотики и средства, вызывающие токсикоманию либо лекарственную зависимость, весьма схожи между собой, что и делает целесообразным рассмотрение техники и методики их анализа в рамках одной монографии.

Для дальнейшего рассмотрения вещества всех трех перечисленных выше групп далее будут именоваться **«контролируемые вещества»** либо **«соединения, подлежащие контролю»** с соответствующей конкретизацией в тех случаях, когда это необходимо и целесообразно.

Объектами химико-аналитического исследования на наличие контролируемых веществ могут быть химические и фармацевтические препараты, растительное сырье для их изготовления, биологические объекты, отобранные у испытуемых субъектов (моча,

кровь, каловые массы, волосы, смывы с кожи и т.п.), и при судебно-химическом исследовании – трупный материал (органы, содержимое желудка, кишечника и т.п.).

Целью химико-аналитического исследования является прежде всего установление наличия данного вещества в изучаемом объекте. В ряде случаев на первое место выступает определение количества этого вещества в организме, например, в случае клинических анализов при диагностике и лечении острых отравлений.

Установление факта присутствия контролируемых веществ в анализируемом объекте, в том числе в организме испытуемых лиц, имеет судебно-правовую значимость. В клиническом анализе часто требуется установление как природы присутствующего контролируемого вещества, так и его содержания, которое во многих случаях определяет необходимость тех или иных мер лечения или экстренной помощи.

Как и любой анализ химического состава вещества химико-аналитическое определение контролируемых веществ включает в качестве основных этапов следующие операции:

- отбор проб;
- подготовка проб;
- аналитическое определение;
- интерпретация результатов.

Все эти фазы анализа должны выполняться при строгом соблюдении всех правил и рекомендаций, относящихся к технике и методике химико-аналитического определения следовых концентраций органических веществ, достаточно подробно изложенных в целом ряде руководств по аналитической химии и по технике выполнения таких анализов с помощью современных методов исследования, таких как различные варианты хроматографии, УФ и ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии и др. [4–10].

Аналитическое определение делится на два этапа: скрининг (экспрессное определение) и целевой анализ. Скрининг – это быстрое определение целевых веществ в пробе. Если скрининг дает отрицательный результат, то дальнейшее исследование не проводится, а при положительном результате обязательно проведение подтверждающего количественного анализа, позволяющего сделать окончательный вывод.

Если три последние этапа не включают каких-либо особенностей по сравнению с другими случаями определения микроколичеств органических веществ в химических или биологических объектах, первый этап – то есть отбор проб – может быть существенно осложнен, вследствие стремления подвергаемых исследованию лиц исказить или скрыть факты наличия контролируемых веществ в исследуемом биологическом объекте. К числу возможных действий такого рода, например, при анализе мочи, можно отнести следующие:

- 1) подмена образца принесенной с собой биожидкостью, заведомо не содержащей контролируемых веществ;
- 2) разбавление пробы мочи при отборе пробы;
- 3) прием большого количества жидкости либо прием мочегонных средств перед отбором пробы;
- 4) временное прекращение приема контролируемого средства (наркотика, допинга) заранее до проведения анализа и отбора пробы.

Такое намеренное искажение состава отбираемых проб представляет собой довольно редкое явление в практике химико-аналитической работы, однако при анализе контролируемых веществ с его возможностью приходится считаться.

Таким образом, при соблюдении необходимых и достаточных условий успешного определения, т.е. при достаточно высокой чувствительности аппаратуры и при достаточной квалификации аналитиков, выполняющих эксперименты, получение полностью отрицательного результата теста может свидетельствовать о наличии двух возможностей:

- а) отсутствия определяемого вещества в анализируемой пробе. В случае наркотических и допинговых средств этот факт может служить указанием на то, что обследуемый субъект вообще не употребляет такие средства или не употребляет их в течение достаточно длительного времени;
- б) преднамеренной фальсификации пробы (подмена, разбавление пробы, прием мочегонных средств).

С другой стороны, положительный результат анализа при соблюдении всех условий, обеспечивающих высокое качество аналитической работы, может свидетельствовать о том, что в анализируемом объекте содержится одно или несколько контролируемых веществ. В случае анализа биожидкостей живого человека это может быть следствием постоянного либо эпизодического приема наркотиков, допинговых средств или иных контролируемых веществ за достаточно короткое время до момента взятия пробы.

В связи с тем что положительный или ложноотрицательный результаты анализа контролируемых веществ могут иметь весьма значительные судебно-правовые последствия, считается необходимым выполнять определения такого рода по крайней мере двумя различными методами, рассматривая первый из них как выявляющий, а второй как подтверждающий. Естественно, при этом подтверждающий метод должен отвечать более жестким требованиям по чувствительности и избирательности.

Литература

1. Веселовская Н.В., Коваленко А.Е., Наркотики, М.: Триада – Х, 2000.
2. Веселовская Н.В., Коваленко А.Е., Папазов И.П. и др., Наркотики. Свойства, действие, фармакокинетика, метаболизм, М.: Изд. дом «Нарконет», 2002.
3. Drug Abuse Handbook, New York: CRC Press, 1998.
4. Жидкостная колоночная хроматография, Дейл З., Мацек К., Янак Я., ред., т. 1-3, М.: Мир, 1978 – 1979.
5. Кирхнер Ю., Тонкослойная хроматография, т. 1, 2, М.: Мир, 1981.
6. Шатц В.Д., Сахартова О.В., Высокоэффективная жидкостная хроматография, Рига, Зинатке, 1988.
7. Заикин В.Г., Варламов А.В., Микая А.И., Простаков Н.С., Основы масс-спектрометрии органических соединений, М.: МАИК Наука, 2001.
8. Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В., Анализ наркотических средств, М.: Мысль, 1993.
9. Литвинов Л.Д., Руденко Б.А., Газовая хроматография в биологии и медицине, М.: Медицина, 1971.
10. Руденко Б.А., Руденко Г.И., Высокоэффективные хроматографические процессы, т. 1, 2, М.: Наука, 2003.
11. Руденко Б.А. Капиллярная хроматография, М.: Наука, 1978, 215 с.

ГЛАВА 2

ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ КОНТРОЛИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

Всемирная организация здравоохранения определяет следующие вещества как средства наркотического характера, являющиеся предметом злоупотреблений:

- алкоголь (этиловый спирт);
- барбитураты и родственные им соединения;
- опиаты (опий, морфин, героин, синтетические аналоги);
- бензодиазепины;
- метаквалон;
- психостимуляторы (кокаин, амфетамины);
- каннабис (гашиш, марихуана);
- галлюциногены (ЛСД, псилоцибин, мескалин, фенциклидин).

Второстепенными психостимуляторами считаются: табак (никотин), кола, кат (абиссинский чай), кофеин (в форме очень крепко заваренного чая или кофе).

Определенное распространение (к сожалению, все более широкое) находят летучие технические растворители, стимулирующие действия и формирующие привычки, характеризующиеся как токсикомания. Проявлением этих привычек является вдыхание паров таких растворителей, порождающее психическое состояние, сходное с тем, которое возникает при приеме наркотических средств. К числу таких веществ относятся: бензин, ацетон, трихлорэтилен (средство химической чистки одежды), хлороформ и эфир.

С другой стороны, следующие группы веществ рассматриваются в качестве запрещенных к применению допинговых средств: стимуляторы нервной системы, наркотики, анаболические агенты, диуретики, гормоны пептидного и гликопротеинового характера и их аналоги. Для каждой из этих групп определены перечни их типичных представителей. Вещества, принадлежащие к запрещенным группам, не могут быть допущены к применению, даже если они прямо не указаны в соответствующих списках. Кроме того, определен круг запрещенных методов, приравниваемых к применению допинговых средств. К числу таких методов относится прием внутрь препаратов крови, красных кровяных телец и тому подобных продуктов. Наконец, являются запрещенными любые фармацевтические, химические или физические добавки и манипуляции, которые могут изменить качественный или количественный состав проб крови или мочи, отбираемых для контроля применения допинговых средств (катетеризация, подмена проб, употребление средств, снижающих ренальную экскрецию других введенных в организм препаратов). Кроме того, имеющиеся в настоящее время правила ограничивают употребление спортсменами алкоголя, каннабиноидов, β -блокаторов, местных анестетиков и системных кортикостероидов.

Этот краткий перечень еще раз показывает тесную связь между собой двух групп контролируемых соединений – наркотиков и допинговых средств – в отношении хи-

мико-аналитических методов выявления их присутствия в анализируемых объектах и определения их концентраций или их количества в анализируемых пробах. В число этих методов в настоящее время входят, в основном, спектрофотометрические методы – УФ-и ИК-спектроскопия, методы жидкостной, тонкослойной и газовой хроматографии. Наиболее полную и исчерпываемую информацию о контролируемых веществах, присутствующих в исследуемой пробе, дает метод хромато-масс-спектрометрии, сочетающий преимущества методов, обеспечивающих разделение присутствующих в пробе компонентов и получение достаточно детальной информации о химической природе каждого из них.

В повседневной практике контроля наркотических и допинговых средств находят применение также и иммуно-химические методы, однако сфера их применения более ограничена.

Для первичного контроля наличия или отсутствия контролируемых веществ в анализируемых пробах применяются и цветные реакции (тест-методы), осуществляемые путем прибавления к исследуемому материалу определенных реактивов.

Комитет по контролю за использованием наркотиков при ООН рекомендует осуществлять постоянный контроль за распространением и применением следующих наркотических средств: опиатов, каннабиноидов, метаквалона, амфетамина и его производных, кокаина, производных 1,4-бензодиазепина, аналогов барбитуровой кислоты, фенциклидина, ЛСД и других галлюциногенов [1, 2]. Ниже основные представители перечисленных групп будут охарактеризованы более подробно.

В практике химико-аналитического контроля приходится встречаться со следующими объектами:

- а) образцы растительного происхождения (мак, конопля, опий, трава эфедры);
- б) экстракты из растительного материала, продукты их частичной переработки;
- в) порошки, твердые материалы, содержащие контролируемые вещества;
- г) таблетки, драже, микстуры;
- д) инъекционные растворы;
- е) биологические объекты (моча, кровь, волосы, ногти, пот, ткани и органы).

В практике контроля допинговых средств в подавляющем большинстве случаев проводится анализ образцов мочи или крови. Целевыми компонентами анализа наркотических и допинговых средств чаще всего являются представители следующих групп химических соединений.

2.1. Опиаты

Названием **опиаты** обозначают группу физиологически активных веществ, алкалоидов, выделяемых из опия, который представляет собой затвердевший млечный сок, вытекающий из надрезов на незрелых головках опийного мака, *Papaver somniferum* [3]. Млечный сок затвердевает на воздухе, образуя опийную смолу или опий-сырец, представляющий собой сложную смесь белков, липидов, смол, восков, сахаров и других веществ, в том числе более 50 алкалоидов, составляющих 10–20% общей массы этого материала.

Наиболее важными алкалоидами опия являются морфин, кодеин, папаверин и тебаин. Два первых алкалоида применяются в качестве лекарственных средств и в то же время используются и как наркотические средства. Папаверин наркотическими свойствами не обладает, но находит широкое применение в качестве лекарства. Тебаин используется,

в основном, в качестве сырья для получения других лекарственных препаратов. Структурные формулы основных алкалоидов опия приведены на схеме 2.1.

Кроме этих веществ, в состав опия входит большое число минорных алкалоидов, содержащихся в количествах порядка десятых долей процента. Среди них наиболее существенны следующие соединения: нарцеин, неопин (δ -кодеин), протопин, порфироксин, криптопин, псевдоморфин, лауданозин.

Обычно в состав опия входят также меконовая кислота (VII) и лактон меконин (VIII). Эти компоненты не обладают наркотическими свойствами, однако, могут оказывать помощь при установлении источника происхождения опия.

Путем относительно несложной химической обработки извлекаемого из опия морфина получают ряд его производных, среди которых имеются соединения с очень высокой

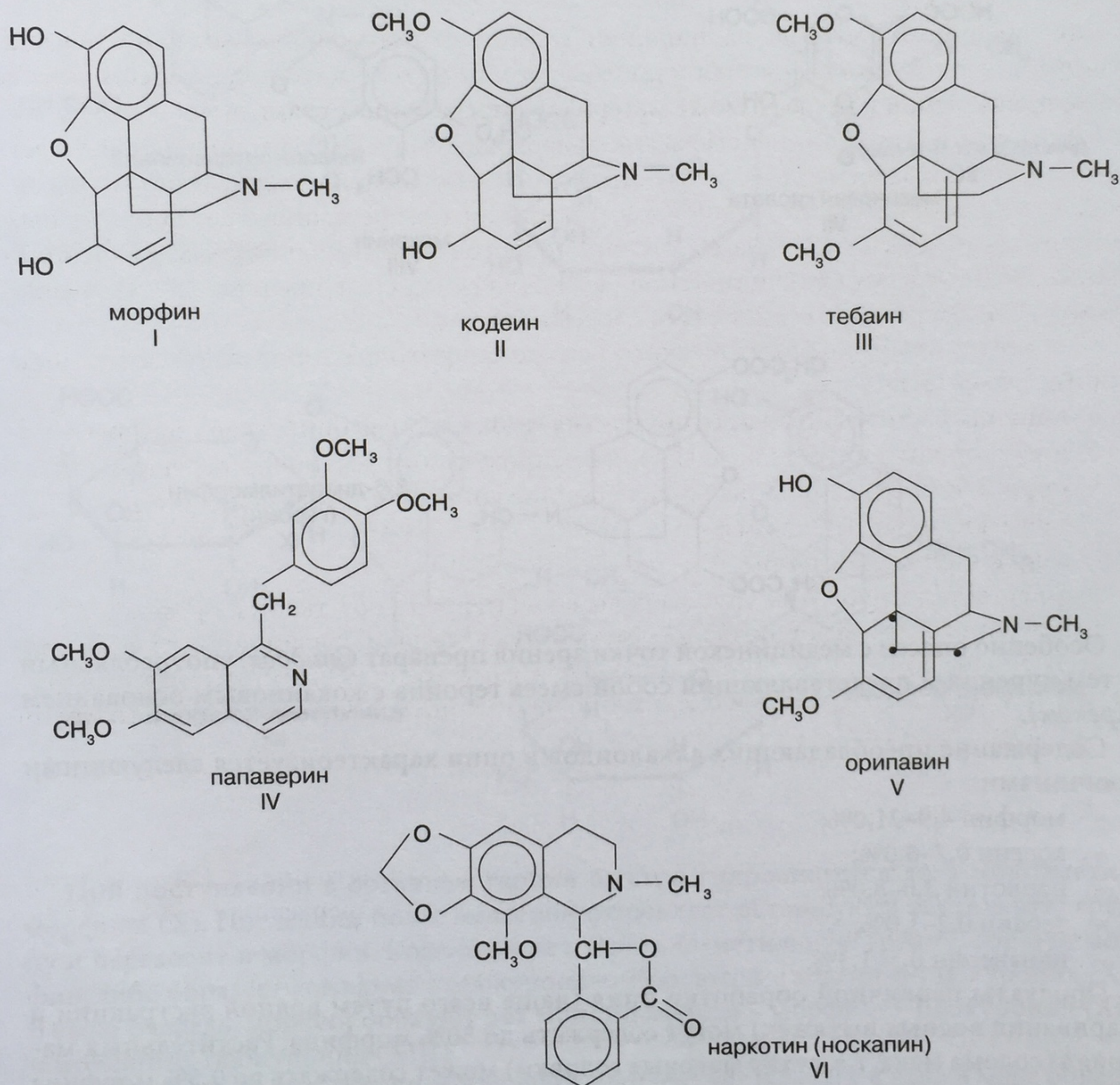
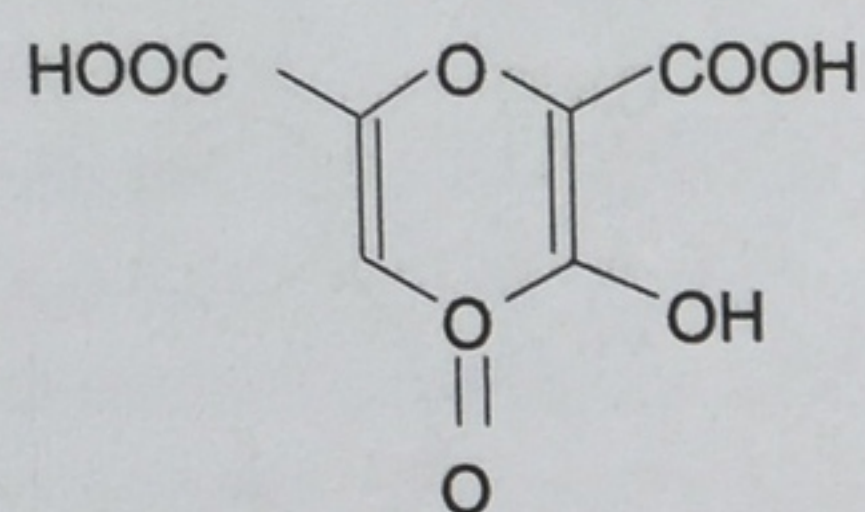


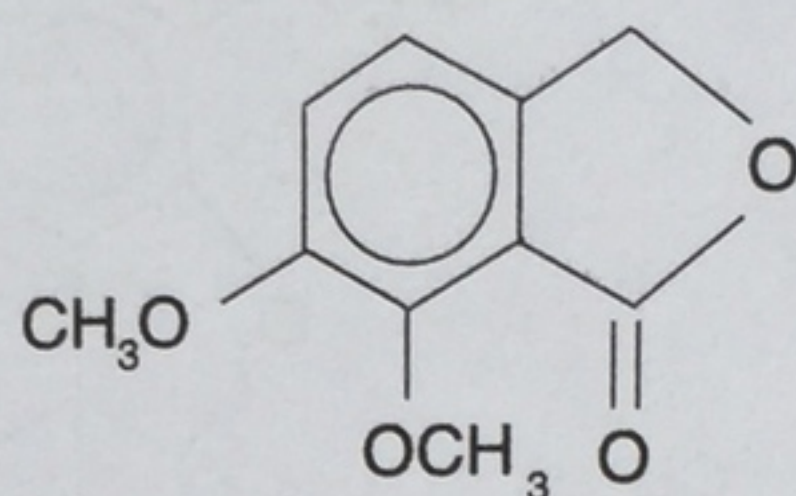
Схема 2.1.

наркотической активностью. Эти вещества называют **полусинтетическими опиатами**. Наиболее известным и распространенным среди них является диацетилморфин – **героин** (IX). Кроме того, известен целый ряд веществ, отличающихся по структуре молекул от морфина, но обладающих сходным, и зачастую значительно более сильным физиологическим действием. Эти вещества принято называть **опиоидами**.

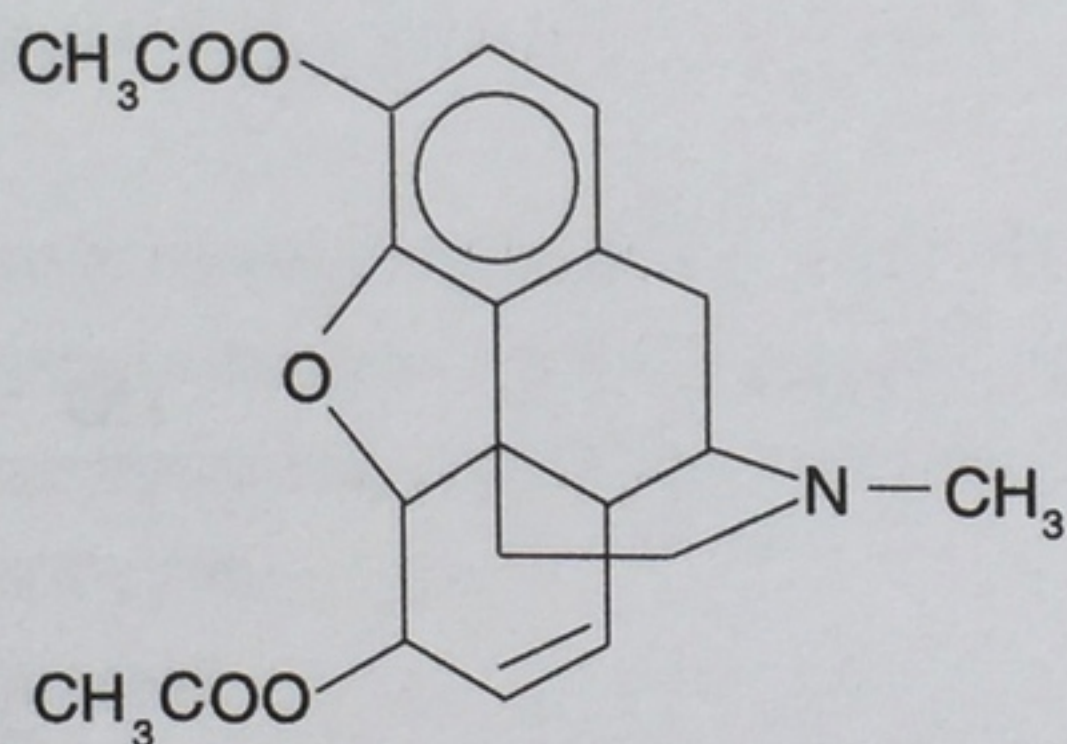
В подпольной продаже морфин разного качества распространяется под названиями *Morph, White, Stuff, Miss, Emma, Monkey* [3, 4]. Героин продают под наименованиями *Smack, Junk, Horse, Stuff*, чистый героин для курения называют *Chinese N3*, а специальный препарат для инъекций *Chinese N4*. Героин, приготовленный непосредственно из опия без сколько-нибудь серьезной очистки, распространяют под названиями *черная смола (Black Tar)*, *мексиканский коричневый (Mexican Brown)*, *грязь (Mud)*.



меконовая кислота
VII



меконин
VIII



3,6-диацетилморфин
(героин)
IX

Особенно опасен с медицинской точки зрения препарат *Спидбол*, употребляемый путем курения и представляющий собой смесь героина с кокаиновым основанием (*Креком*).

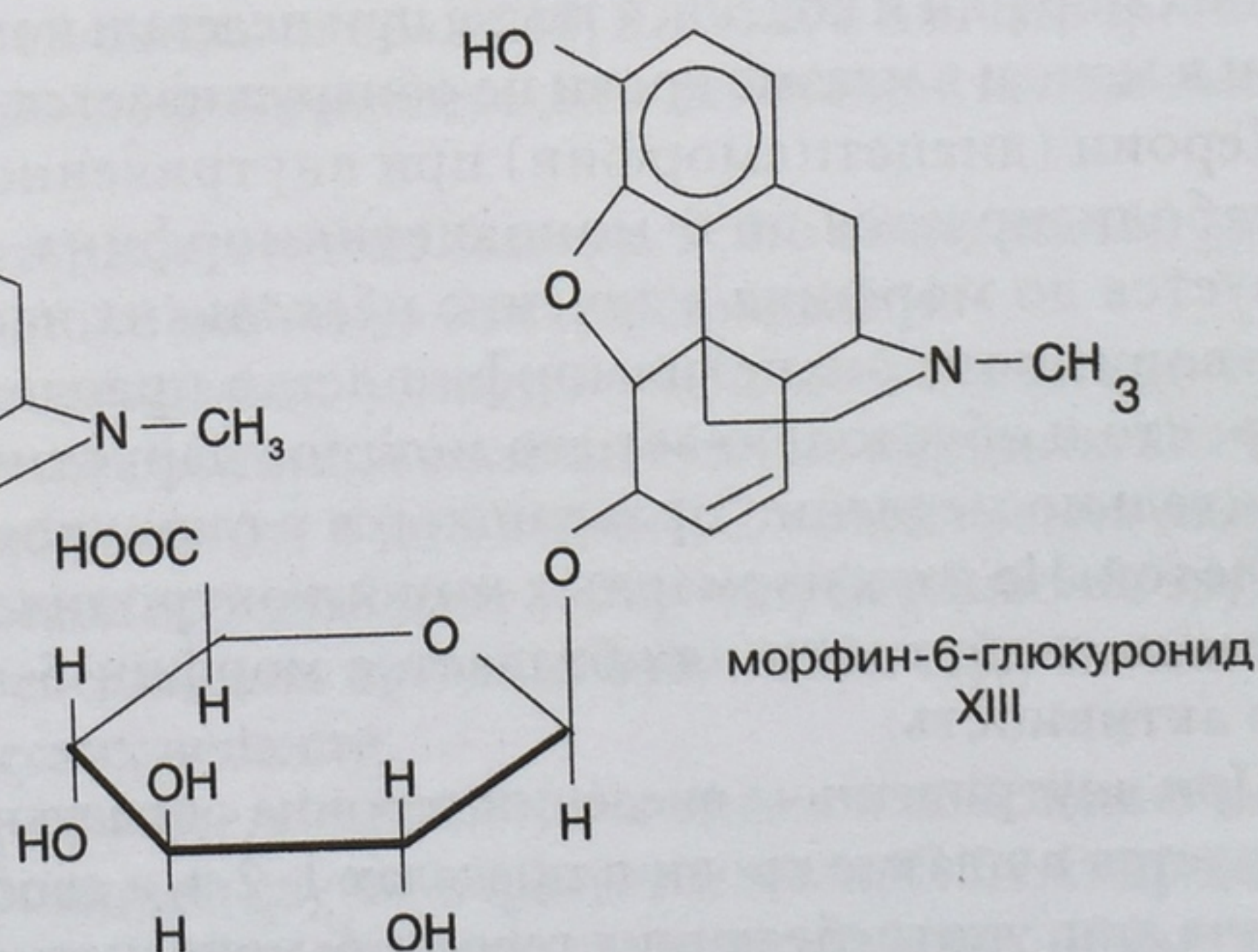
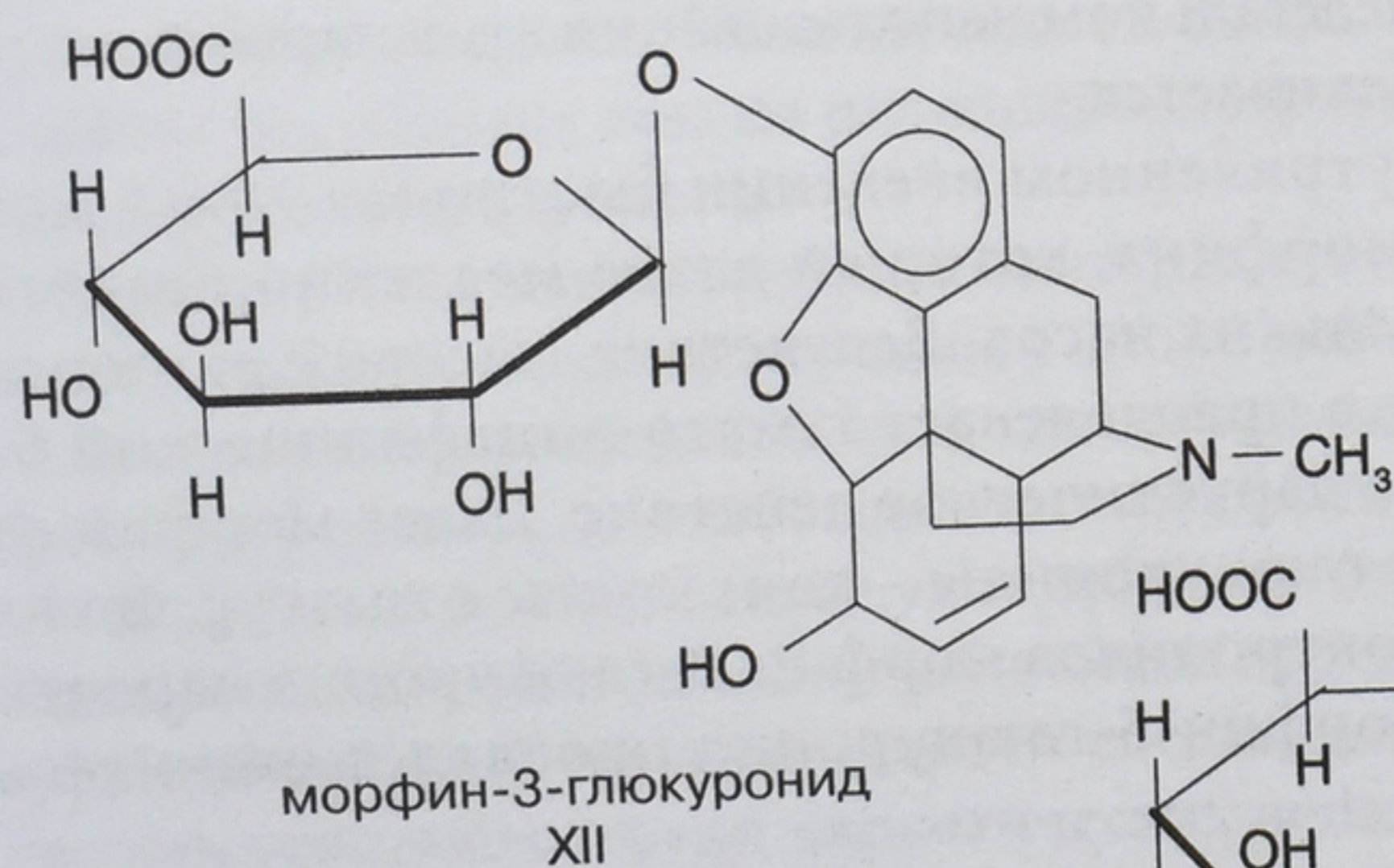
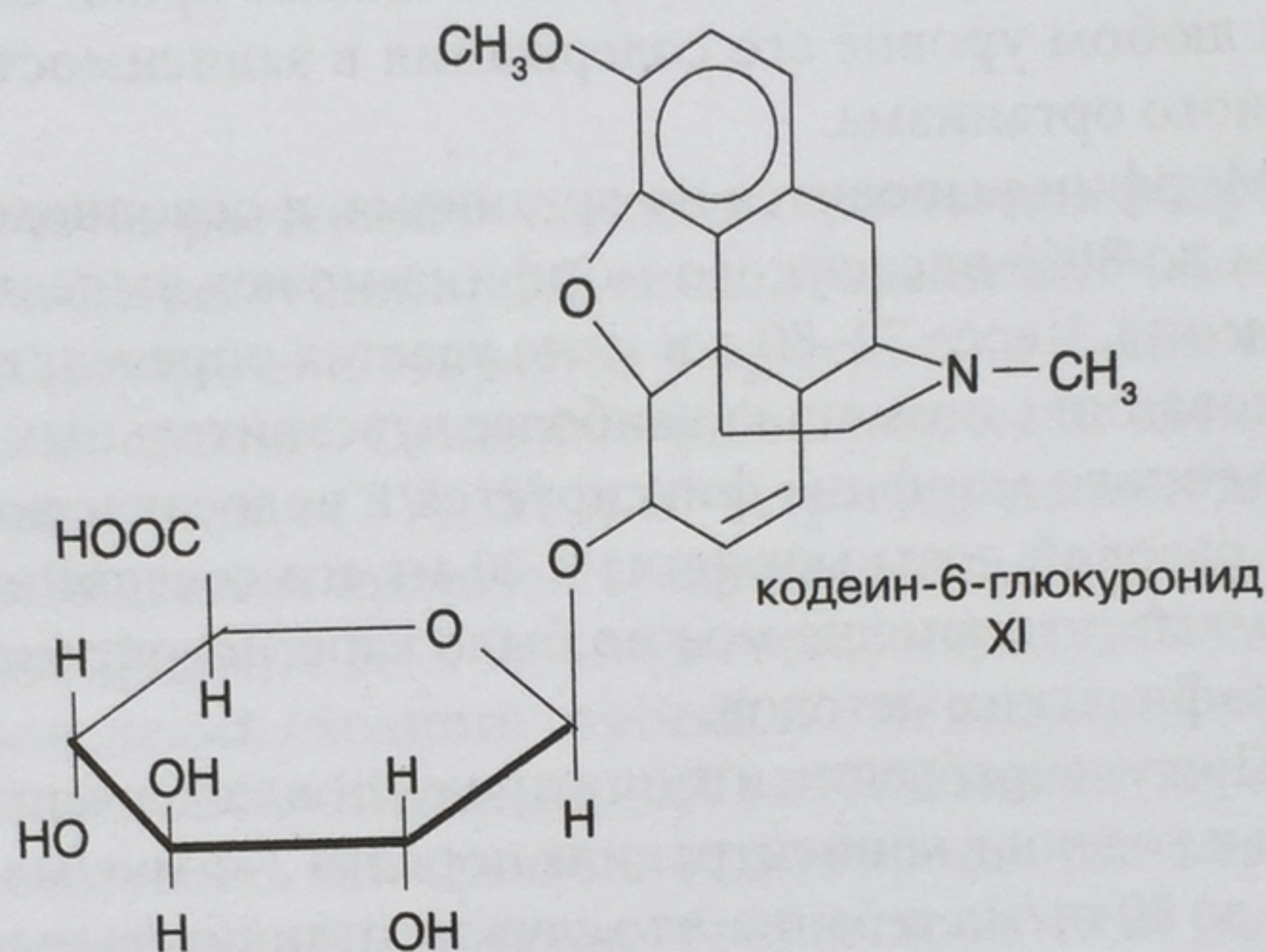
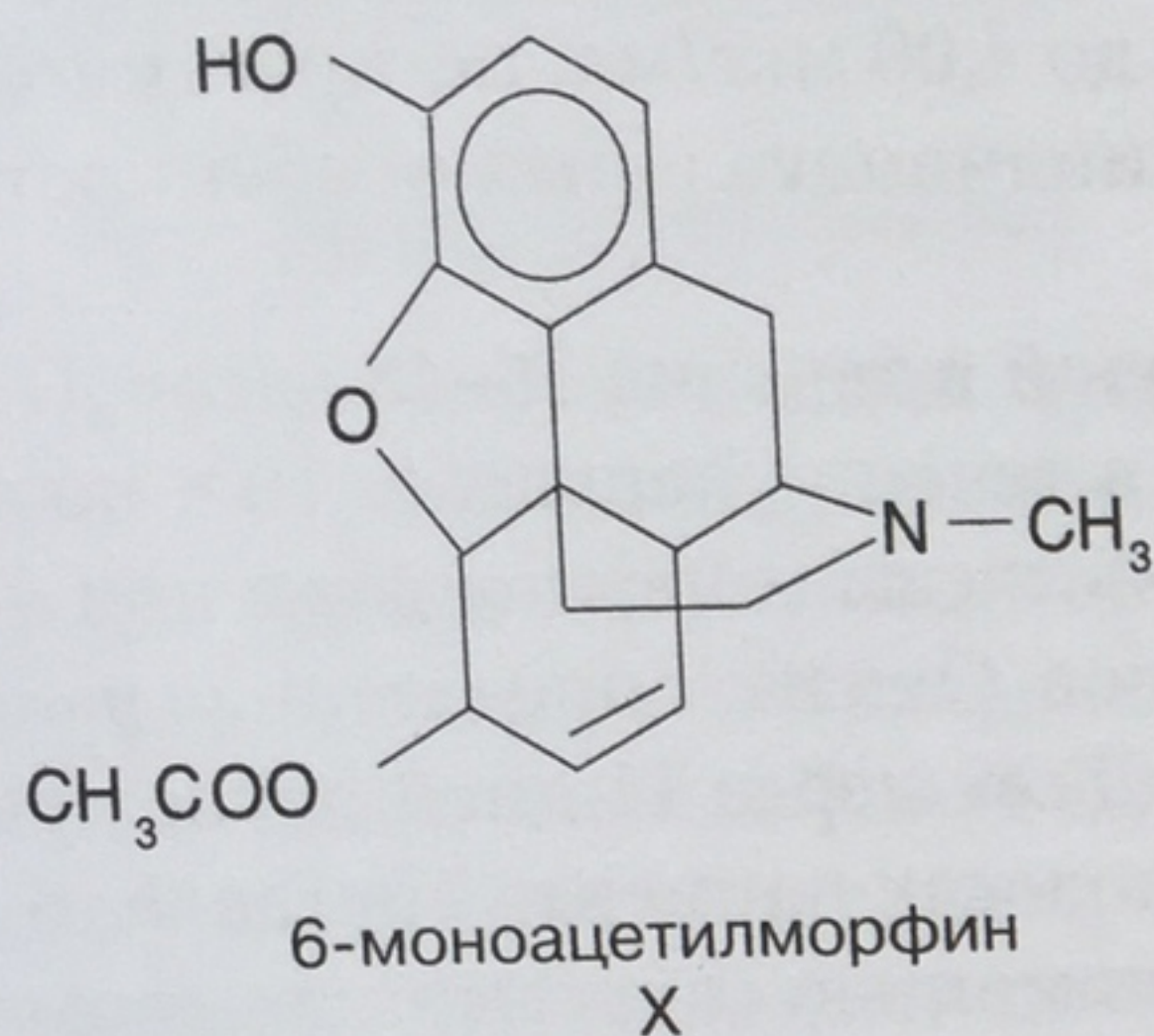
Содержание преобладающих алкалоидов в опиоиде характеризуется следующими величинами:

- морфин 4,9–21,0%;
- кодеин 0,7–3,0%;
- наркотин 2,0–8,0%;
- тебаин 0,2–1,0%;
- папаверин 0,5–1,3%.

Продукты первичной обработки опия (чаще всего путем водной экстракции и упаривания водных вытяжек) могут содержать до 50% морфина. Растительный материал (солома мака, т.е. сухие маковые головки) может содержать до 0,5% морфина и более 3,5% тебаина.

Наиболее опасным наркотиком группы опиатов является героин (3,6-диацетилморфин), достаточно простоготавливаемый из морфия в подпольных лабораториях путем

ацетилирования морфина уксусным ангидридом. Состав уличных препаратов героина, называемого *Smack, Junk, Horse, Stuff* и др., варьирует в достаточно широких пределах при содержании диацетилморфина от 20 до 80–90%. Наиболее частыми примесями являются 6-моноацетилморфин (1–15%) – продукт неполного ацетилирования морфина или частичного гидролиза диацетилморфина, ацетилкодеин (2–5%) до 10% наркотина и 0,01–0,04% основных исходных продуктов – морфина и кодеина.



При поступлении в организм героин быстро гидролизруется до 6-моноацетилморфина (X). Последний более медленно отщепляет оставшуюся ацетильную группу и переходит в морфин. Кодеин может терять O-метильную группу, образуя морфин, либо образует конъюгат с глюкуроновой кислотой – кодеин-6-глюкуронид (XI). В свою очередь, морфин образует два моноглюкозида – морфин-3-глюкуронид (XII) и морфин-6-глюкуронид (XIII).

При приеме внутрь морфина или опия в количестве 0,5–1,0 г в день в моче обнаруживается до 0,64 мг/мл свободного морфина и 0,37 мг/мл кодеина [4, 5–7]. Содержание конъюгированных алкалоидов оказывается при этом примерно в 10 раз больше.

Наряду с 3-О-глюкуронидом при трансформации морфина в организме образуется и 3-О-сульфат, однако его количество обычно в 6–20 раз меньше.

В следовых количествах при трансформации морфина в организме образуется N-оксид морфина и морфин-3,6-диглюкуронид. Они присутствуют обычно в концентрациях порядка 0,15 мкг/мл.

В плазме крови концентрации морфина порядка 0,08–0,12 мкг/мл рассматриваются как терапевтические, 0,15–0,50 мкг/мл – как токсические. Летальный исход может наступить при содержании морфина в плазме крови от 0,05 до 4,00 мкг/мл, т.е. практически при любом уровне его содержания в зависимости от индивидуальных особенностей данного организма.

Морфин выводится из организма, в основном, с мочой в течение 36–48 часов. При этом до 80% введенного морфина может выделяться в течение первых 8–10 ч после введения. Через 72–80 ч в моче удастся определять лишь следы морфина даже при исследовании с помощью наиболее чувствительных методов. Однако определенная часть введенного морфина фиксируется в волосах и ногтях. Даже через 11 дней после приема разовой дозы морфина в 20 мг его содержание в волосах пациента составляло \approx 1,3 мкг/г, что вполне можно было зарегистрировать с помощью современных хроматографических методов.

При употреблении в пищу продуктов, содержащих мак, в моче обнаруживаются морфин и кодеин в концентрациях порядка 2–3 мкг/мл. Одновременно выявляется наличие от 2 до 80 нг/мл тебаина, что служит отличительным признаком пищевого поступления этих веществ в организм. При введении в организм лекарственных препаратов, содержащих морфин и кодеин, а также при нелегальном использовании этих наркотиков тебаин в моче и в плазме крови не обнаруживается.

Героин (диацетилморфин) при внутривенном введении быстро (за 10–12 мин) метаболизируется до 6-моноацетилморфина, который далее медленно деацетируется до морфина в течение нескольких часов. Вследствие высокой липидной растворимости диацетилморфин легко преодолевает гемато-энцефалический барьер, что и обуславливает его мощное наркотическое действие. Далее морфин относительно медленно превращается в глюкурониды – конъюгаты с глюкуроновой кислотой. Из двух изомерных моноглюкуронидов морфин-3-глюкуронид наркотическими свойствами не обладает, а морфин-6-глюкуронид проявляет значительную активность.

При внутривенном введении героина образующийся 6-моноацетилморфин регистрируется в плазме крови в пределах 1–2 ч, а свободный морфин в пределах 10–12 ч. В моче лиц, употребляющих героин, 6-моноацетилморфин регистрируется в пределах 6–8 ч, а морфин – вплоть до 48 ч и более.

В случае смерти потерпевших от передозировки героина диацетилморфин, как правило, не идентифицируется в крови, но содержится в концентрации до 90 нг/мл в моче. В то же время 6-моноацетилморфин регулярно выявляется в крови в концентрации порядка 6–18 нг/мл и в моче на уровне 200–780 нг/мл.

По своим физико-химическим свойствам опиаты представляют собой типичные аминокислоты с молекулярной массой от 284 до 415.

В химико-аналитической практике приходится встречаться с представителями этой группы как в форме оснований, так и в виде солей (хлоргидратов, сульфатов, ацетатов, фосфатов). Все представители этой группы наркотических веществ растворимы в воде

и в этиловом спирте. Они плавятся (чаще всего с разложением) при 200–208°С и способны возгоняться, образуя аэрозоли, что и определяет возможность их введения в организм путем курения.

Основные представители этой группы имеют характерные УФ- и ИК-спектры и показывают характерные сигналы в масс-спектрах. Эти их особенности, используемые для химико-аналитического обнаружения и количественного определения, разобраны ниже в соответствующих разделах.

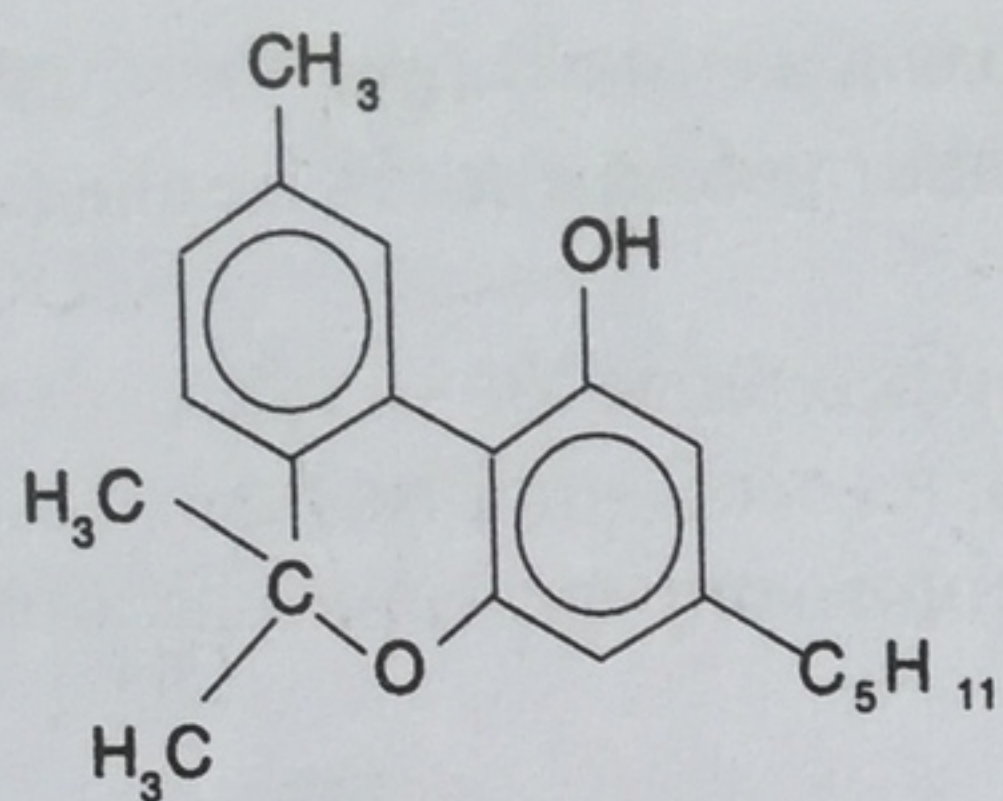
2.2. Каннабиноиды

Эта группа соединений продуцируется растениями конопли, причем для потребления наркоманами используются все части растения, кроме плодов (орешков). Чаще всего для курения используют препараты листьев и соцветий (марихуана), а также смесь пыльцы и смолистых веществ (гашиш, смолка). Основные физиологически активные компоненты – каннабинол (XIV), каннабидиол (XV), Δ^9 - и Δ^8 -тетрагидроканнабинолы (XVI) и (XVII) и Δ^9 -тетрагидроканнабиноловая кислота. Нумерация атомов углерода в молекуле этих соединений показана при формуле XVI. Однако в состав марихуаны входит более 70 биологически активных соединений сходного строения. Эти вещества имеют молекулярные массы в пределах от 314 до 342. Соединения XVI и XVII имеют температуры плавления 210 и 213°С, соответственно. Все каннабиноиды хорошо растворимы в спирте и ацетоне, ограниченно растворимы в малополярных растворителях (хлороформ, диэтиловый эфир) и малорастворимы в воде. Спиртовые растворы соединений XVI и XVII поглощают УФ-излучение с длинами волн 283, 276 и 278 нм. Интересно отметить, что, обладая весьма интенсивным физиологическим действием, каннабиноиды не содержат атомов азота.

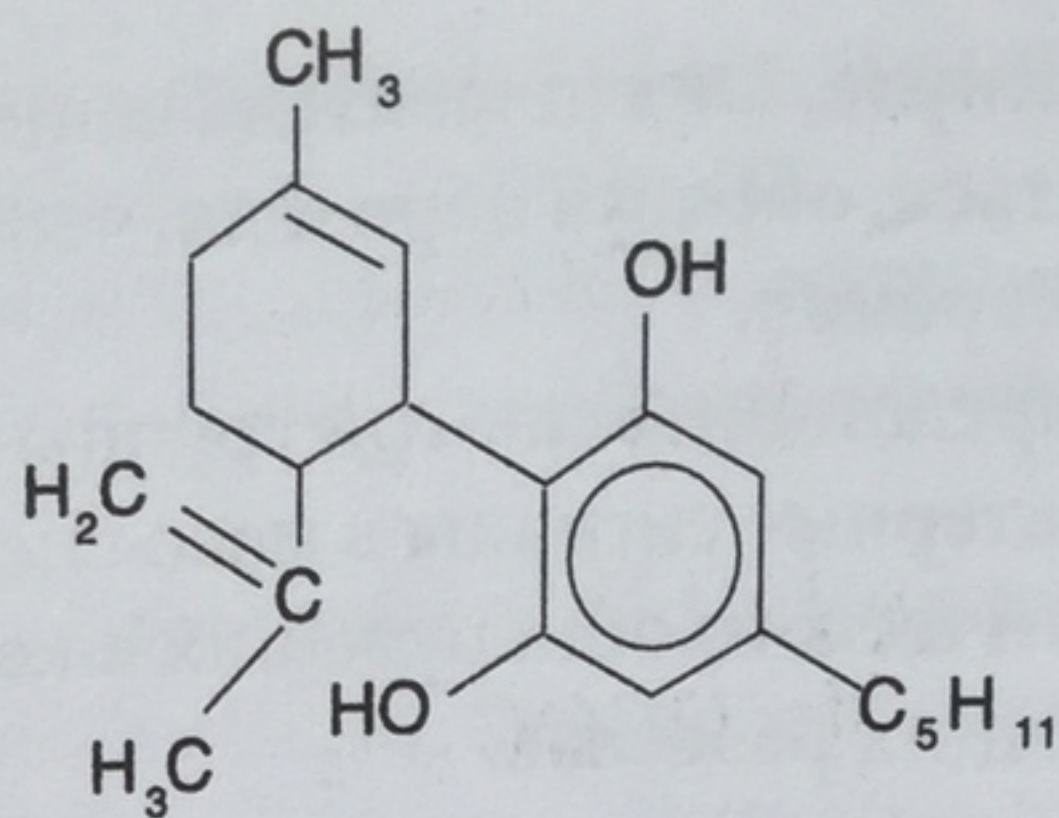
При курении каннабиноиды всасываются очень быстро, всего за несколько минут, однако уровень их концентрации в крови довольно быстро снижается.

В тканях, богатых липидами, каннабиноиды остаются очень долго и выводятся из организма с мочой, калом, выделениями слюнных и молочных желез в среднем в течение 13–40 дней после последнего употребления (от 4 до 77 дней). С точки зрения химико-аналитического контроля каннабиноиды представляют собой одну из наиболее трудных групп объектов. В то же время эти соединения представляют собой одну из наиболее распространенных групп наркотических веществ.

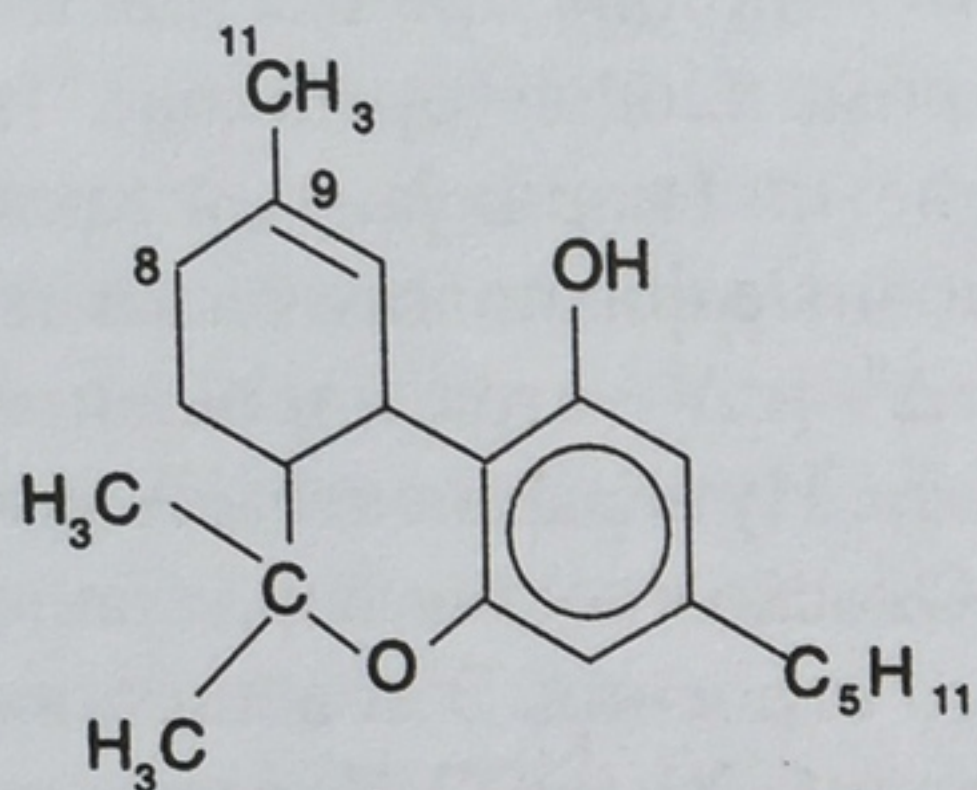
Метаболизм каннабиноидов в организме, в основном, сводится к окислению каннабиноидов в положениях 8 и 11. В последнем случае образуется диол XVIII. Гидроксильная группа при атоме углерода 11 далее может окисляться до карбоксила, образуя кислоту XIX. Гидроксилирование в положение 8 приводит к образованию двух изомерных продуктов α и β окси- Δ^9 -тетрагидроканнабинолов и α и β дигидрокси- Δ^9 -тетрагидроканнабинолов. В настоящее время известно более 75 метаболитов каннабиноидов, выделяющихся с мочой.



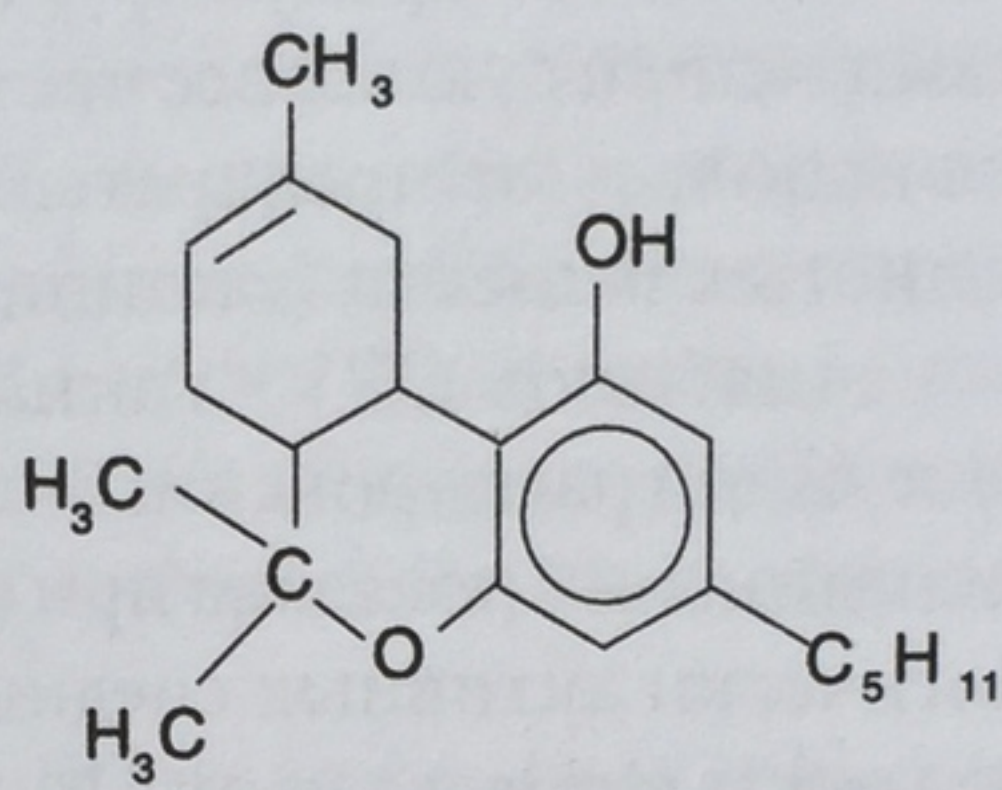
каннабинол
XIV



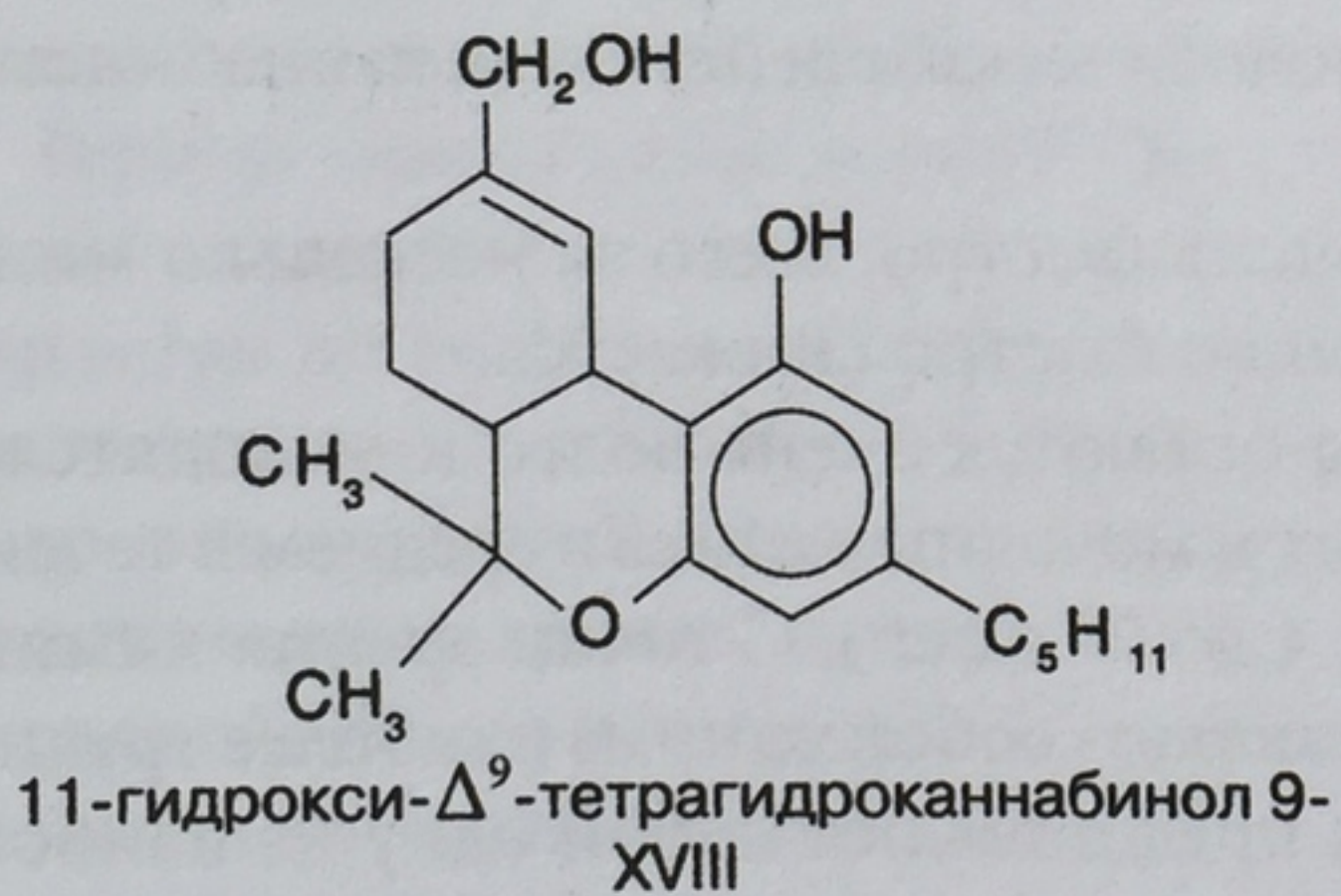
каннабидиол
XV



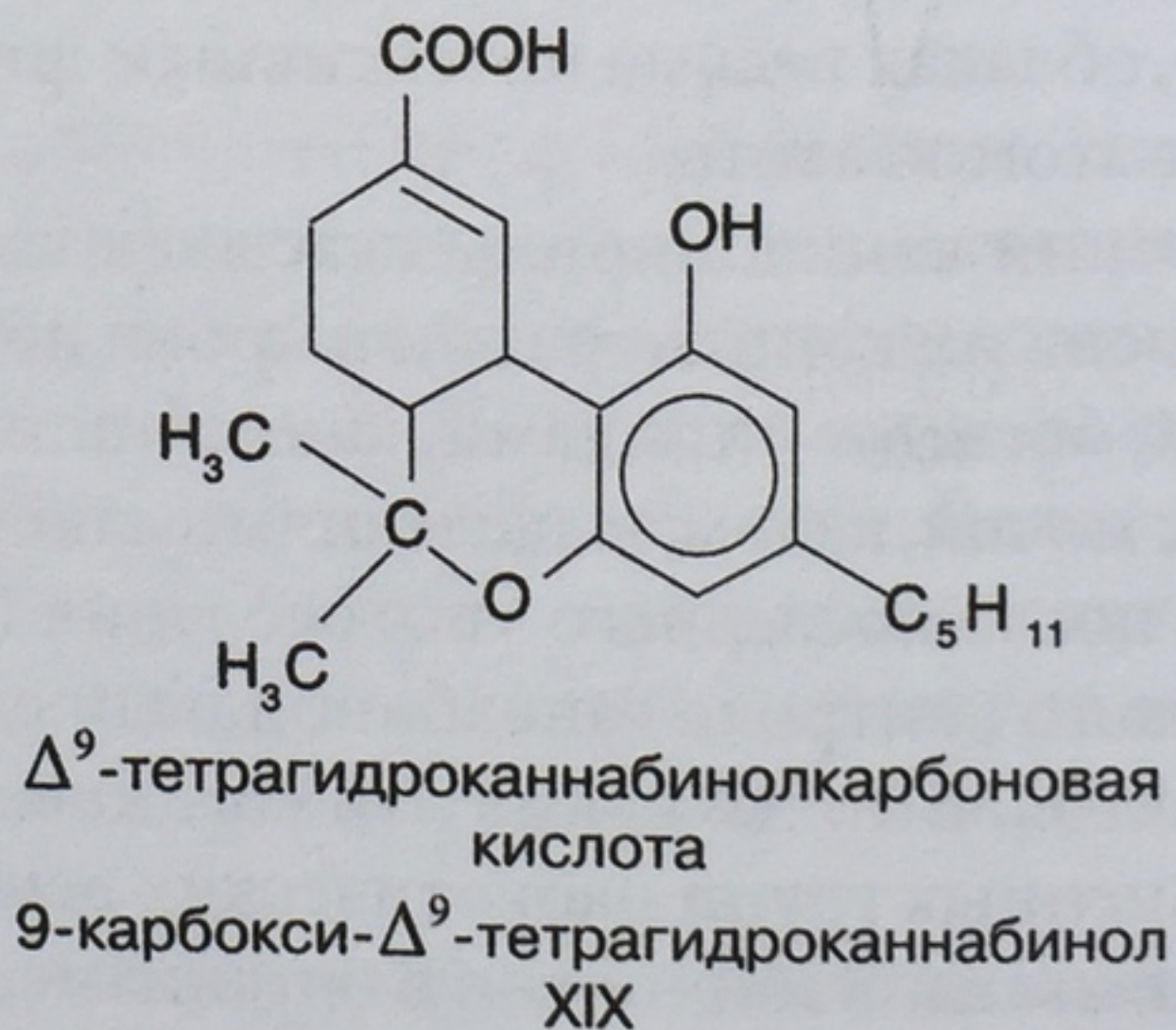
Δ^9 -тетрагидроканнабинол
XVI



Δ^8 -тетрагидроканнабинол
XVII



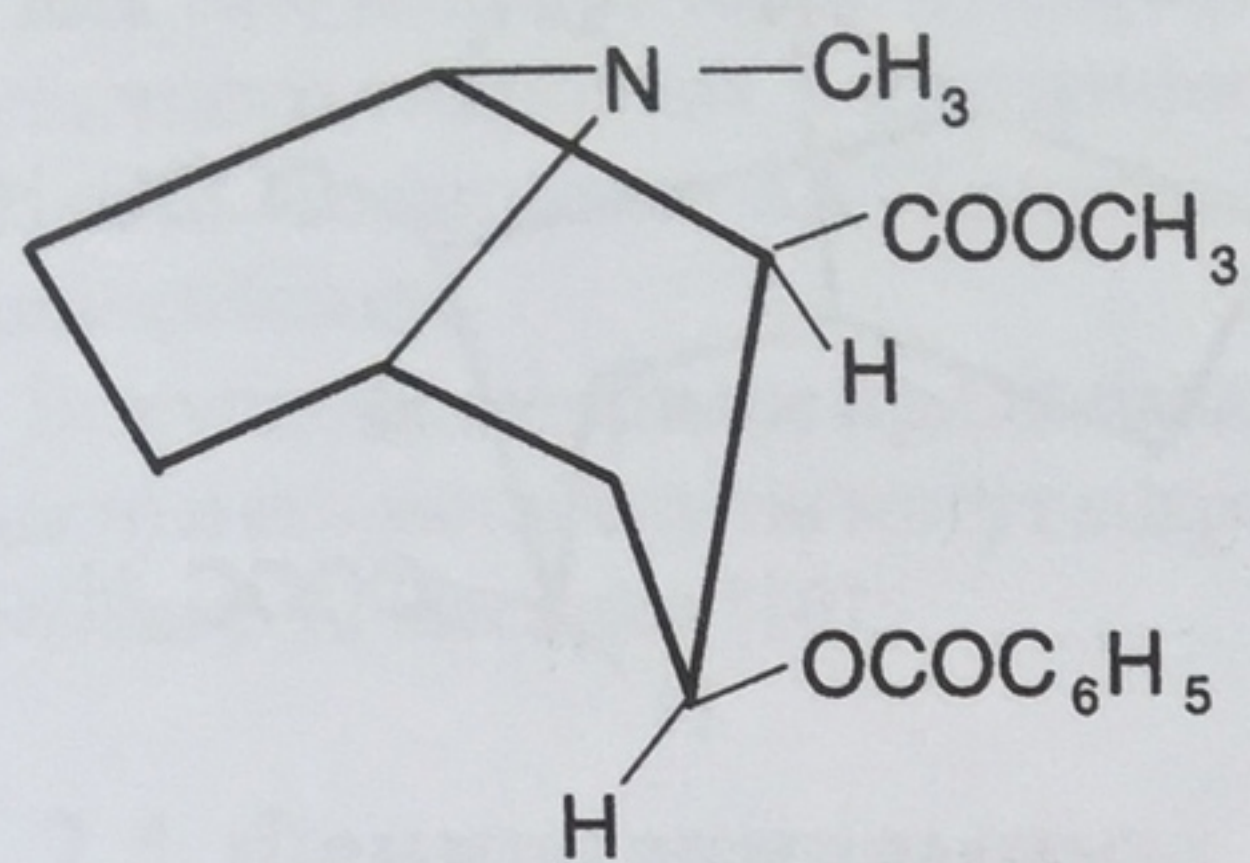
11-гидрокси- Δ^9 -тетрагидроканнабинол 9-
XVIII



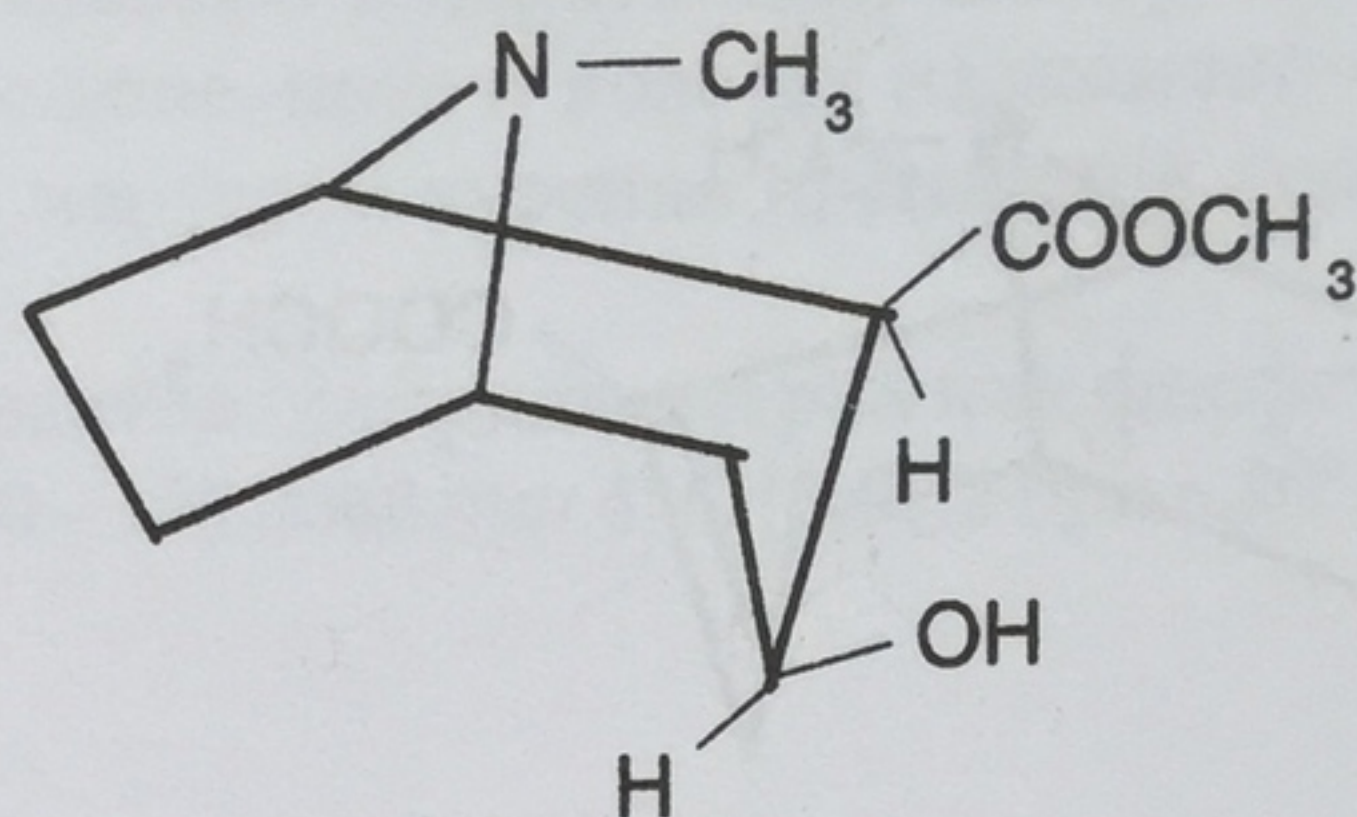
Δ^9 -тетрагидроканнабинолкарбоновая
кислота
9-карбокси- Δ^9 -тетрагидроканнабинол
XIX

2.3. Кокаин

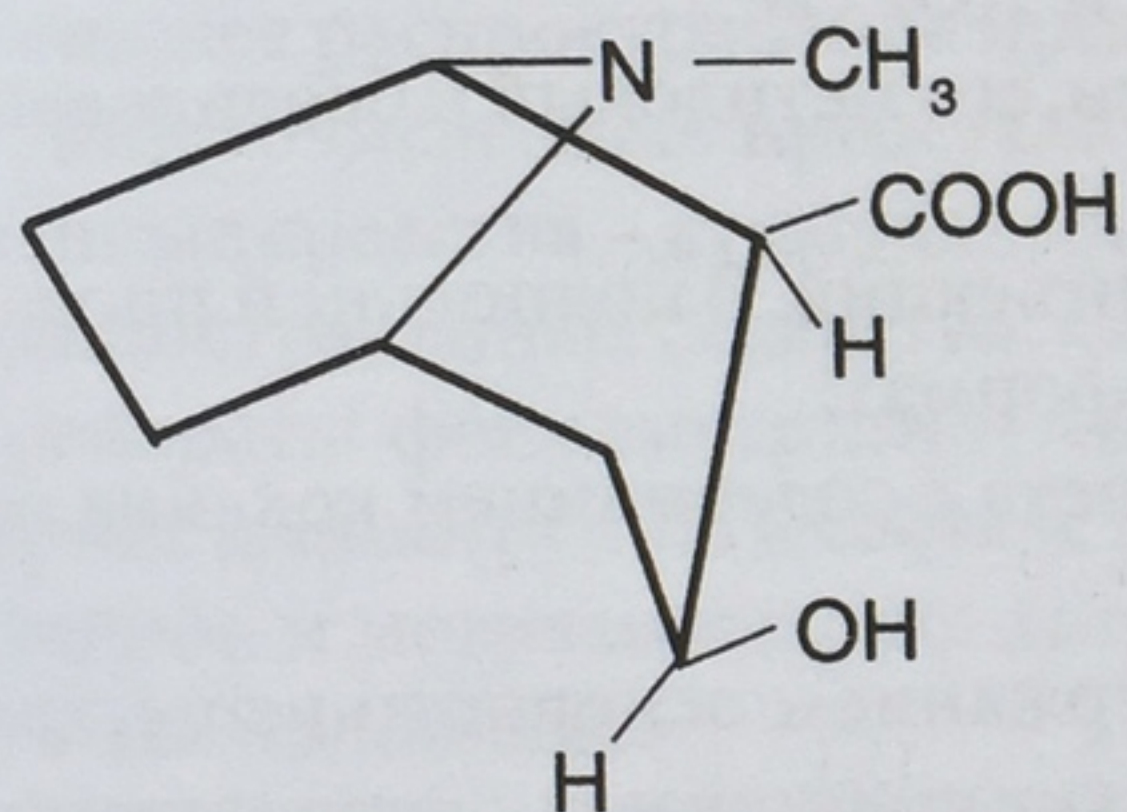
Широко распространенное наркотическое вещество **кокаин** (XX), в основном, получается из листьев кокаинового куста (*Erythoxylon coca*) и является представителем группы соединений, близко родственных в химическом отношении. В эту группу входят: алкалоид **экгонин** (XXI), продукты его частичной этерификации **бензоилэкгонин** (XXII) и **метилэкгонин** (XXIII), а также образующиеся в процессах метаболизма продукт деметилирования кокаина – **норкокаин** (XXIV) и его окисления по фенильной группе – **оксикокаин** (XXV).



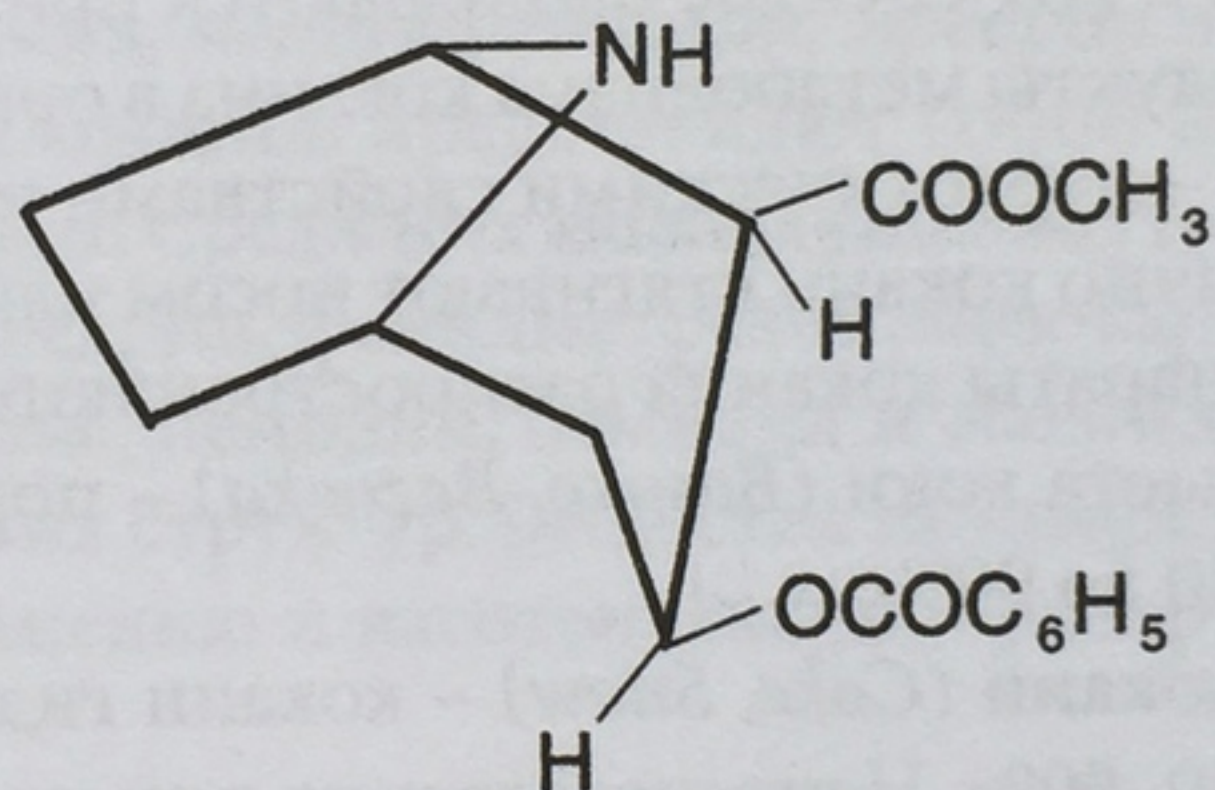
кокаин
XX



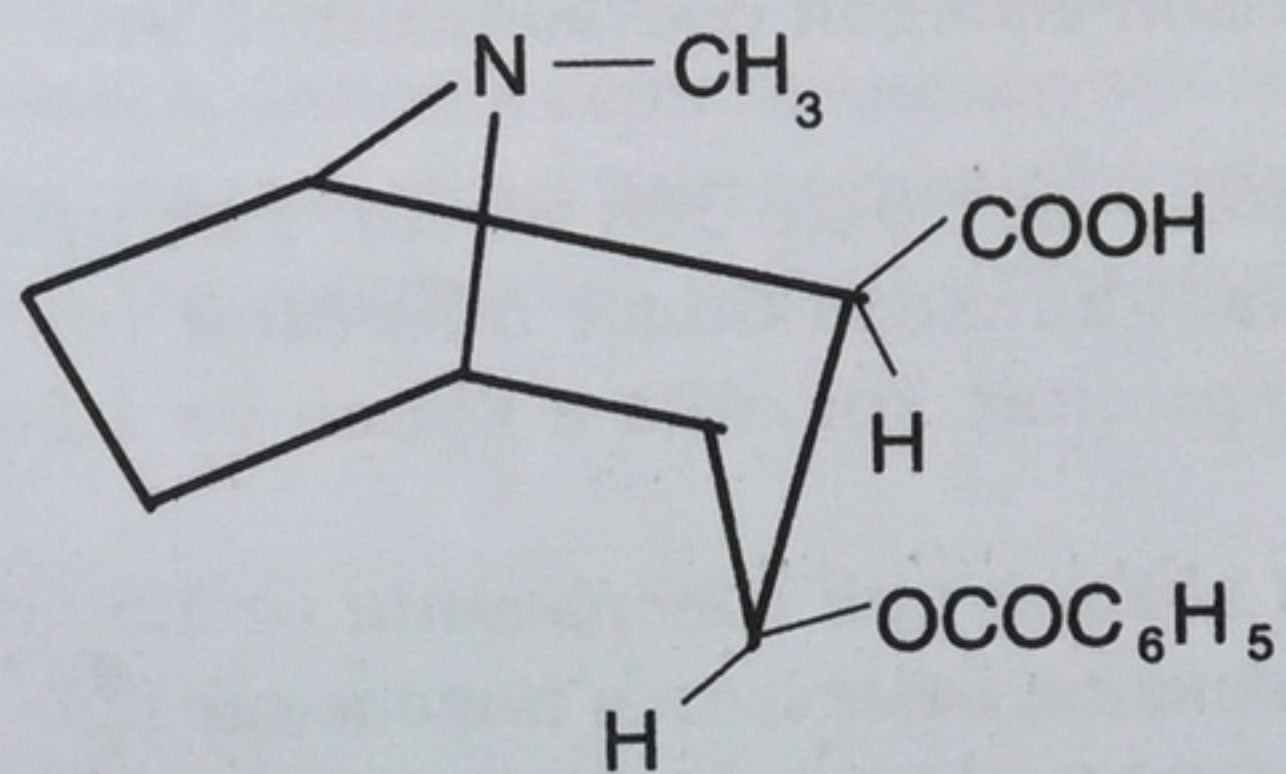
метилэкгонин
XXIII



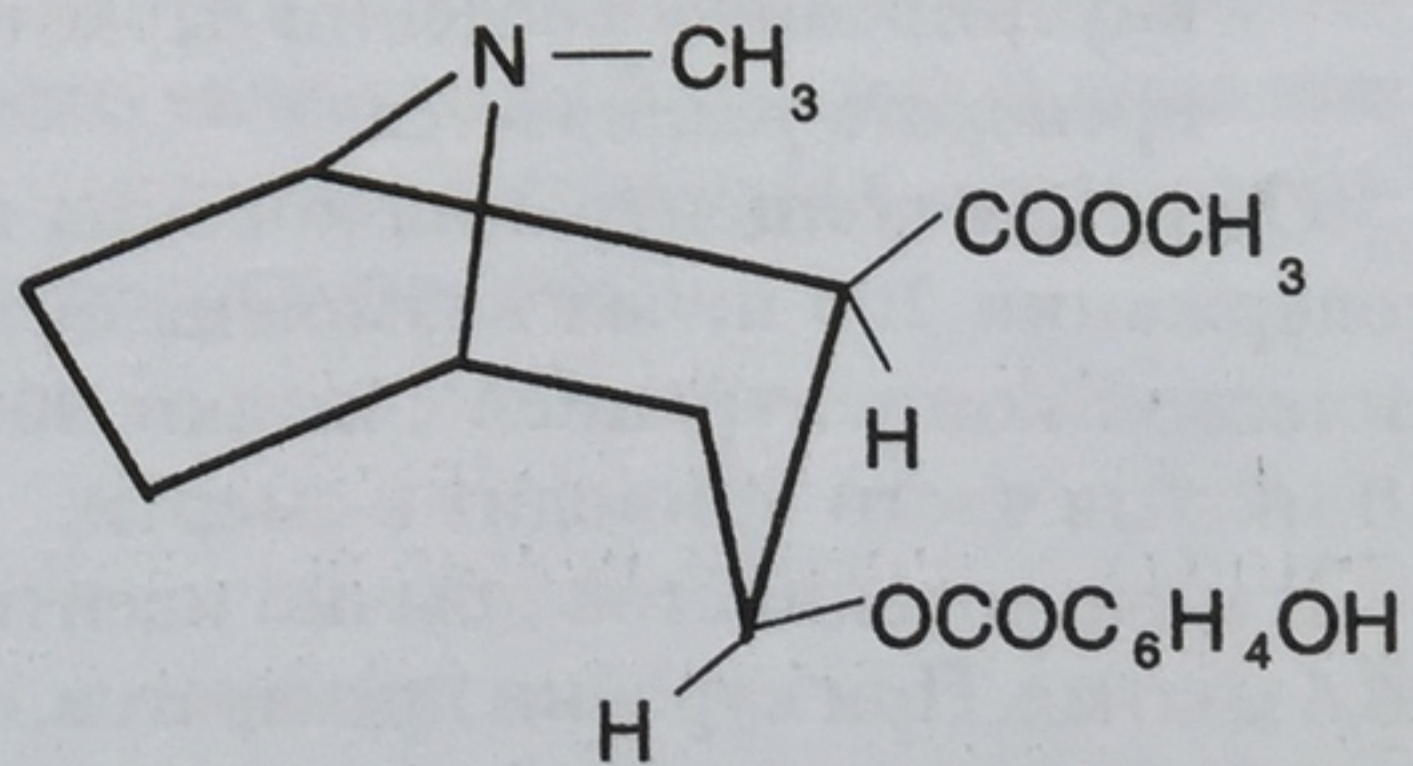
экгонин
XXI



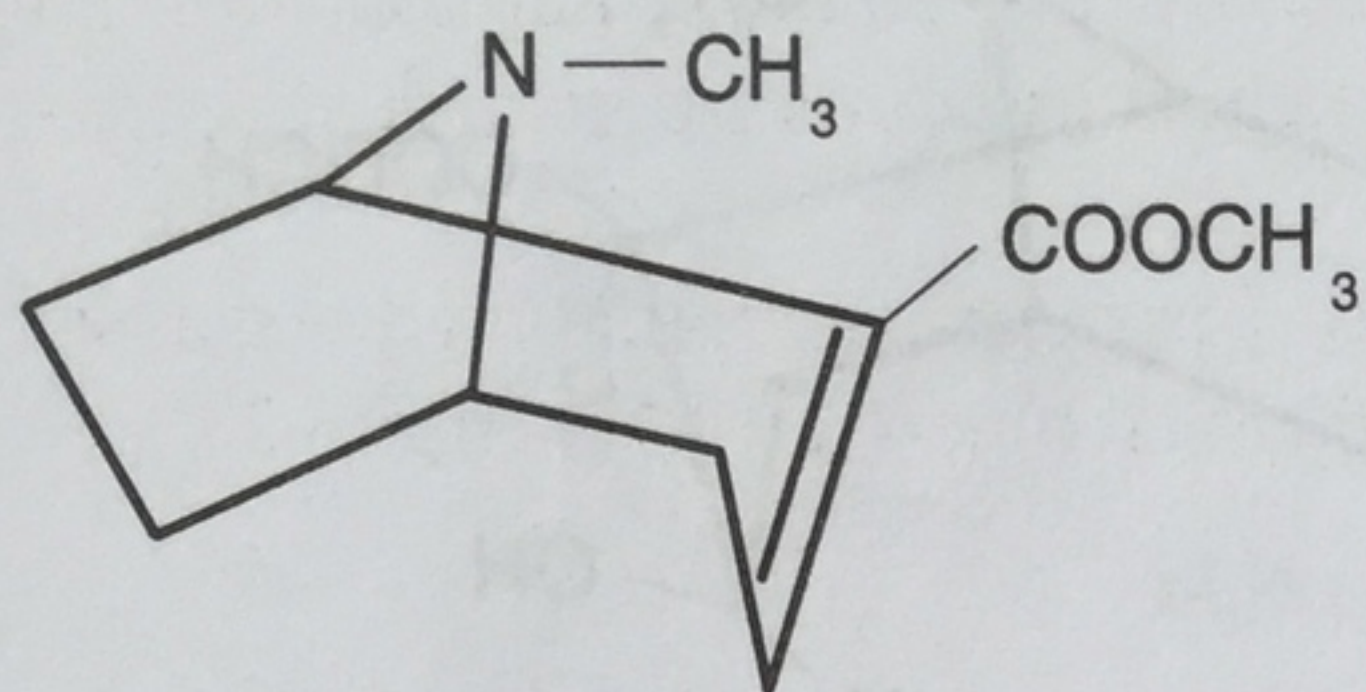
норкокаин
XXIV



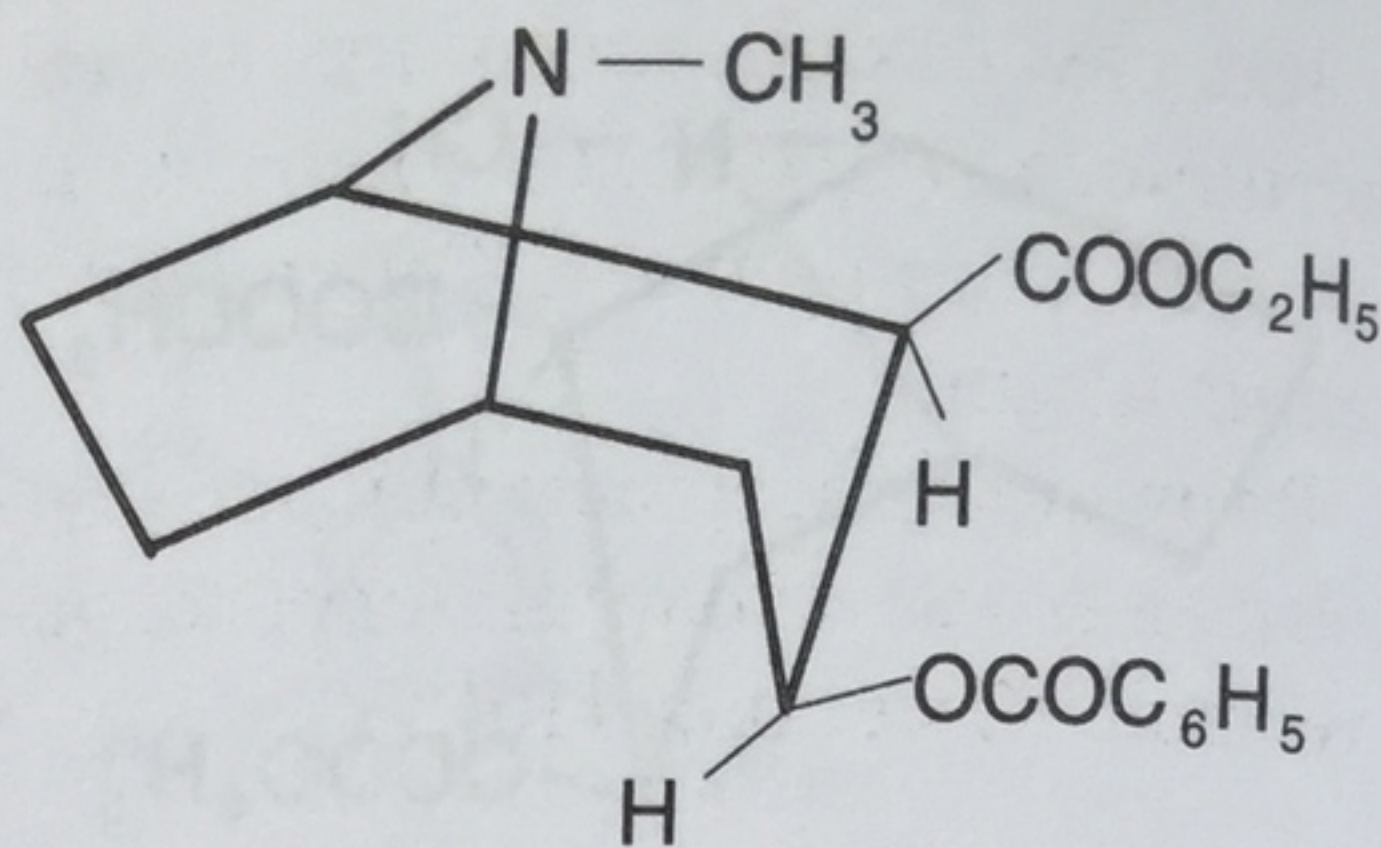
бензоилэкгонин
XXII



оксикоккаин
XXV



метилловый эфир ангидроэконина
XXVI



кокаэтилен
XXVII

Все перечисленные соединения встречаются в форме свободных оснований и в форме гидрохлоридов. Последние хорошо растворимы в воде и в спирте. В форме основания кокаин плохо растворим в воде, однако хорошо растворяется в органических растворителях.

В УФ-свете кокаин имеет два максимума поглощения при 233 и 275 нм. Характерные полосы в ИК-спектре наблюдаются при 1710, 1118, 1275 и 1037 см⁻¹.

Продукты метаболизма кокаина в организме – экгонин, его метиловый и бензиловый эфиры – наркотическими свойствами не обладают.

Обычно кокаин втягивают носом или вводят путем инъекций. В подпольной продаже препараты кокаина распространяются в следующих формах:

- паста коки (*Basuko, Bazooka*) – порошок белого цвета с содержанием кокаина от 40 до 90%;
- кокаин (*Coke, Snow*) – кокаин гидрохлорид с содержанием основного вещества 80–90%. Непосредственно при продаже этот продукт смешивают с суррогатами, в качестве которых используют либо синтетические местные анестетики (лидокаин, прокаин, бензокаин), либо иные суррогатные разбавители (лактоза, глюкоза, маннит, крахмал, борная кислота, сода и др.). Эти вещества могут добавляться к кокаину в разных соотношениях, вплоть до 7:3;
- кокаин основание (*крэк, Crack, Kock*) – препарат, используемый для курения, который плавится при 98°С и испаряется при более высокой температуре;
- смесь крэка и героина – *спидбол* – представляющая собой исключительно опасный наркотик, вызывающий очень быстрое привыкание. При курении или при внутривенном введении наркотическое действие каждой составляющей этого препарата усиливается.

Обычная концентрация кокаина в плазме крови – от 50 до 300 нг/мл. Уже при содержании 200 нг/мл возможна острая интоксикация, хотя более обычной токсической концентрацией считают 900 нг/мл. Содержание кокаина в крови от 1 до 10 мкг/мл часто приводит к смерти.

В моче кокаинистов обычно идентифицируется кокаин при содержании от 1,5 до 26,6 мкг/мл. При курении препаратов, содержащих кокаин, отмечается появление продукта пиролиза кокаина с отщеплением бензойной кислоты – метилового эфира ангидроэконина (XXVI), а при совместном употреблении кокаина и алкоголя в крови и в моче появляется этиловый аналог кокаина – токсичный кокаэтилен (XXVII).

Как сам кокаин, так и продукты его метаболизма – в первую очередь, продукты частичного гидролиза – идентифицируются в слюне, поте и волосах наркоманов до 5–7 дней. Соединение XXVI является надежным маркером курения препаратов, содержащих кокаин.

В трупном материале при добавлении консервантов (фториды натрия или фосфаты) кокаин и его метаболиты могут сохраняться до 110 – 150 дней при 4° С [8, 9], а при – 20° С – в течение 12 месяцев [10].

2.4. Фенилалкиламины

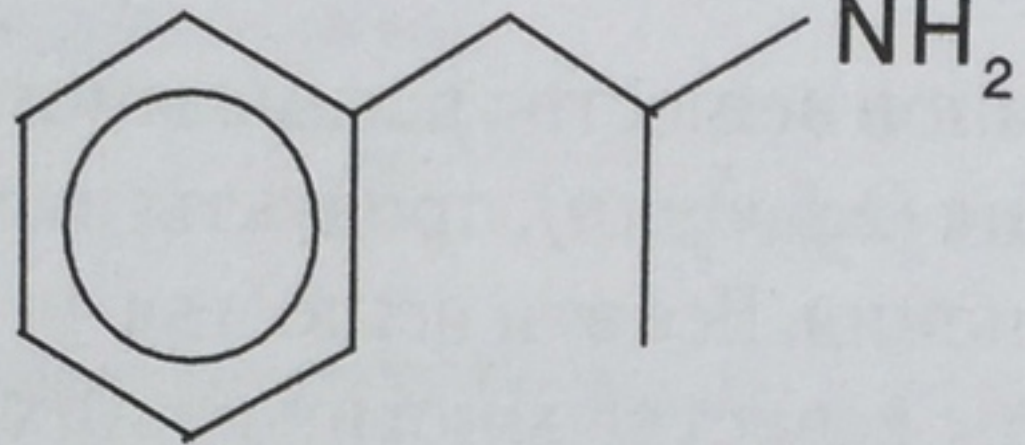
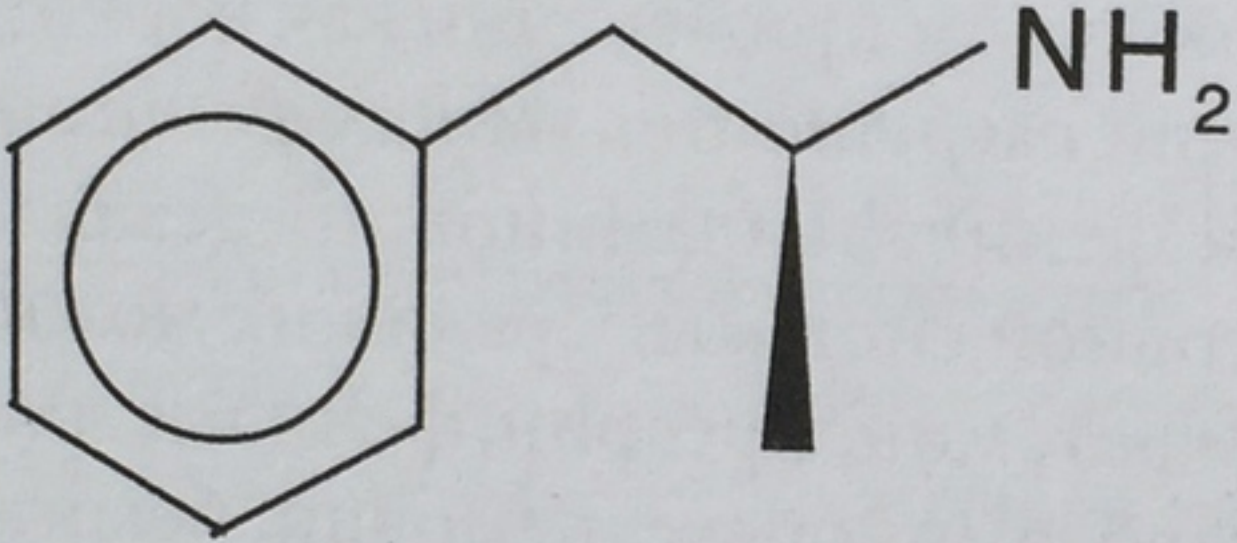
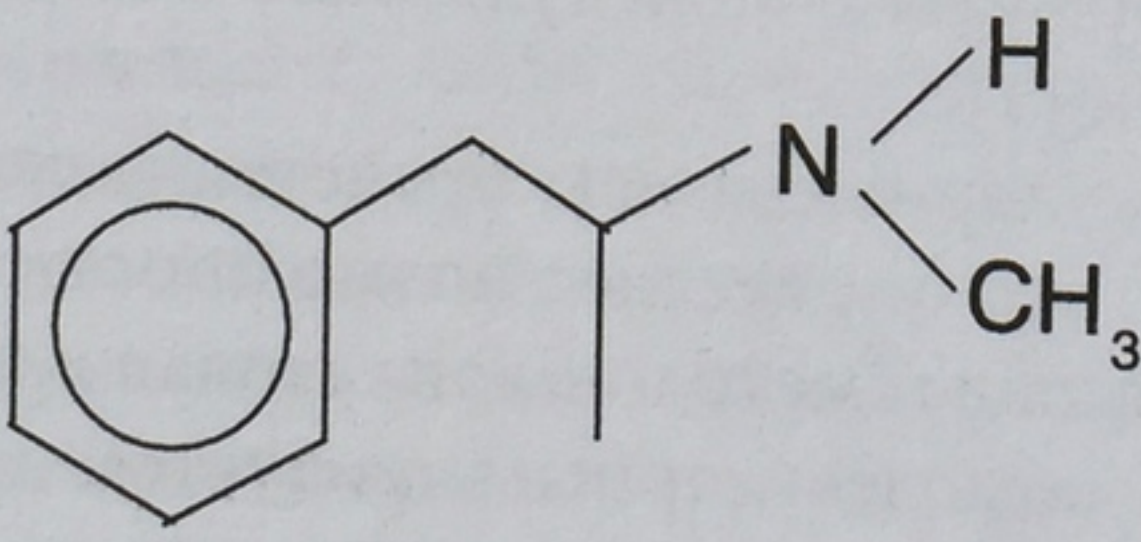
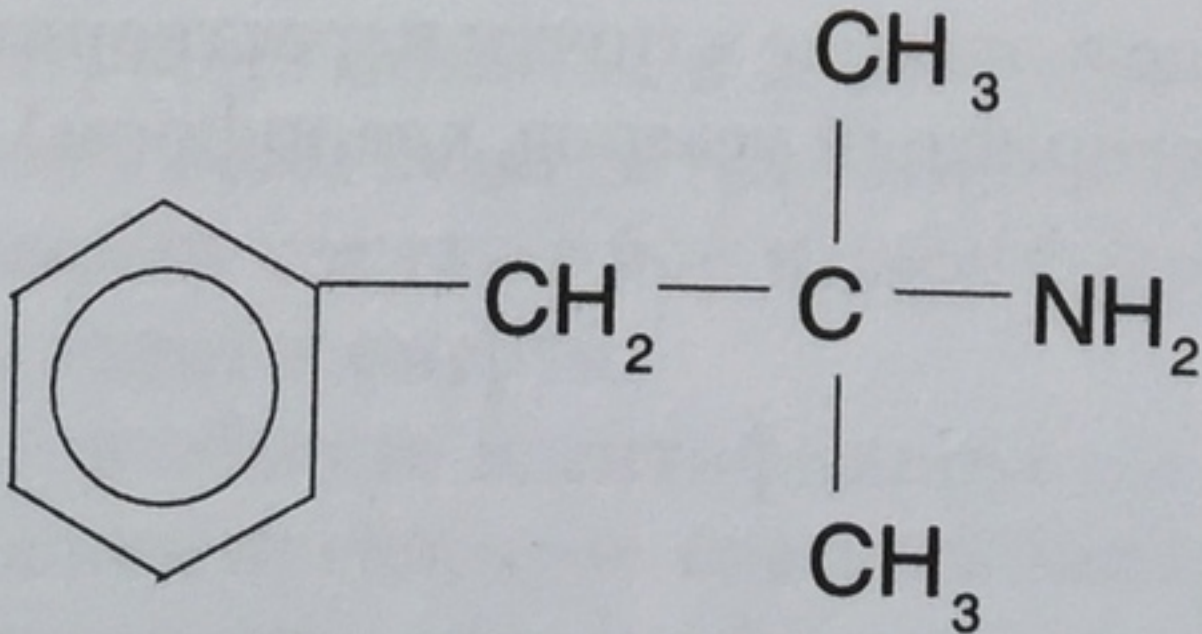
Входящие в группу фенилалкиламинов вещества весьма многочисленны и включают соединения природного происхождения (*эфедрин*), продукты их химической модификации (*эфедрон*) и синтетические соединения. Все эти вещества являются стимуляторами центральной нервной системы. В этом качестве многие из них применяются с целью активизации психической деятельности, снятия физической и психической усталости. Среди этих веществ имеются распространенные лекарственные средства, используемые в медицине для лечения депрессивных состояний. В то же время ряд представителей этой группы веществ используется в подпольном применении как наркотики. Среди них наибольшее распространение приобрели *амфетамин*, *метамфетамин*, *эфедрон* и др.

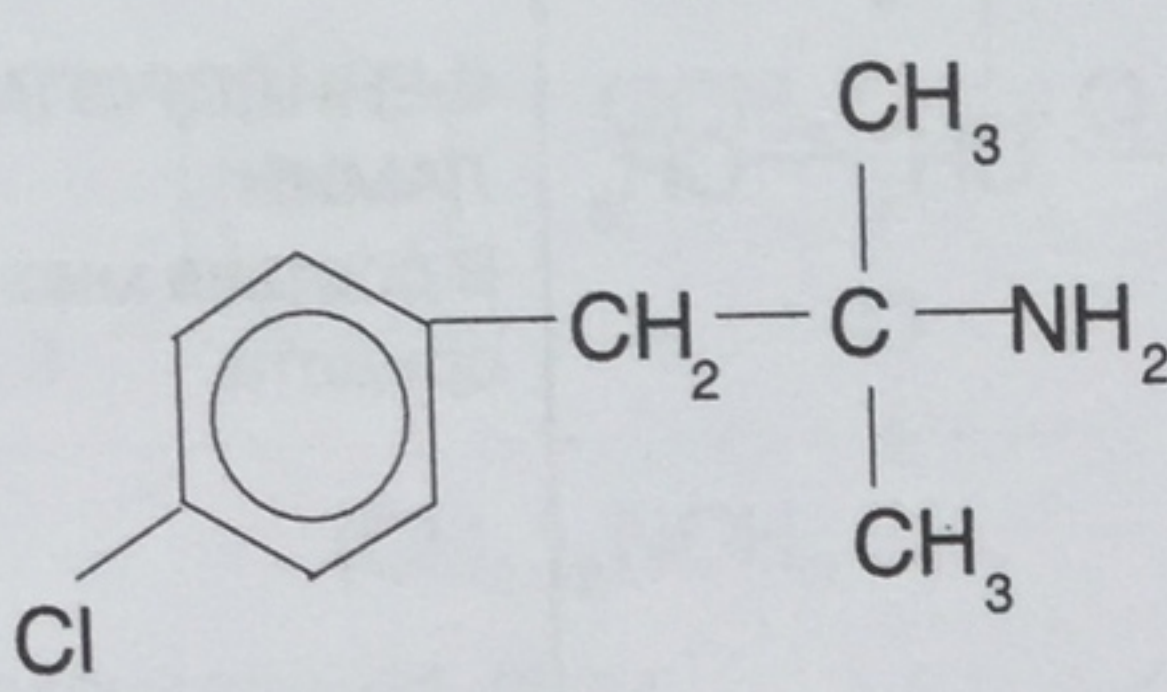
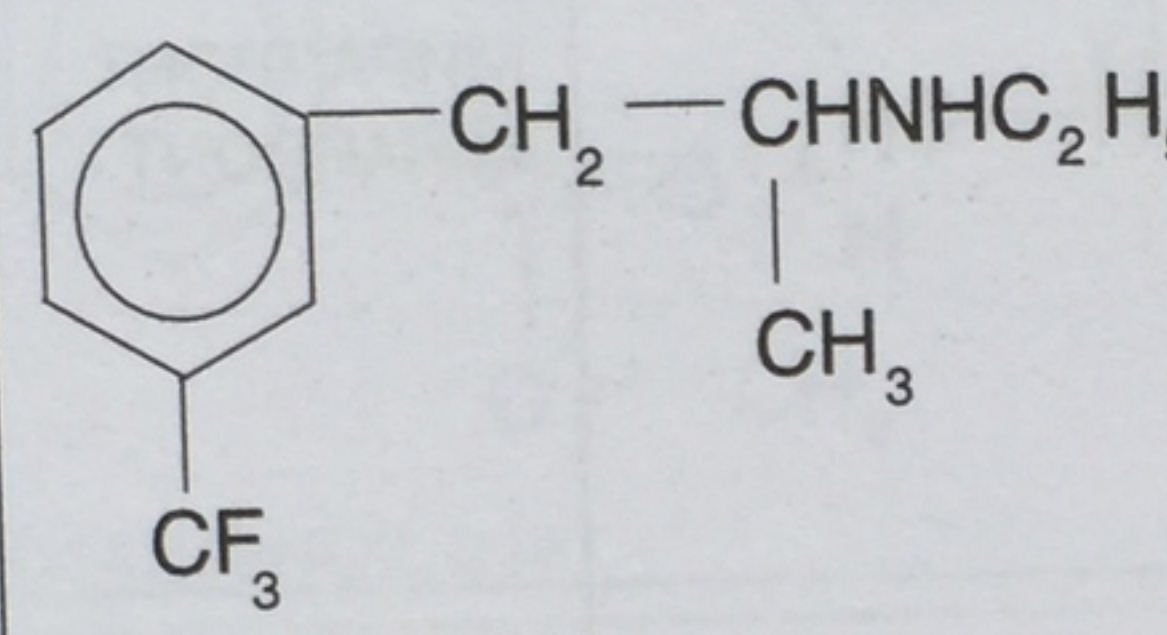
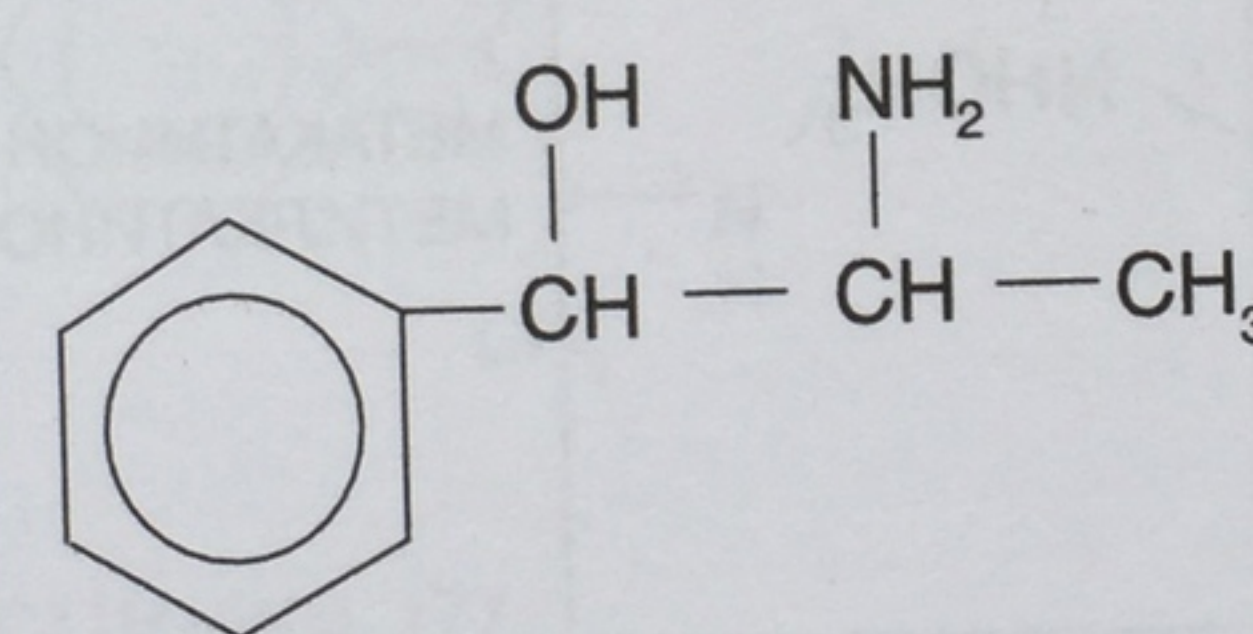
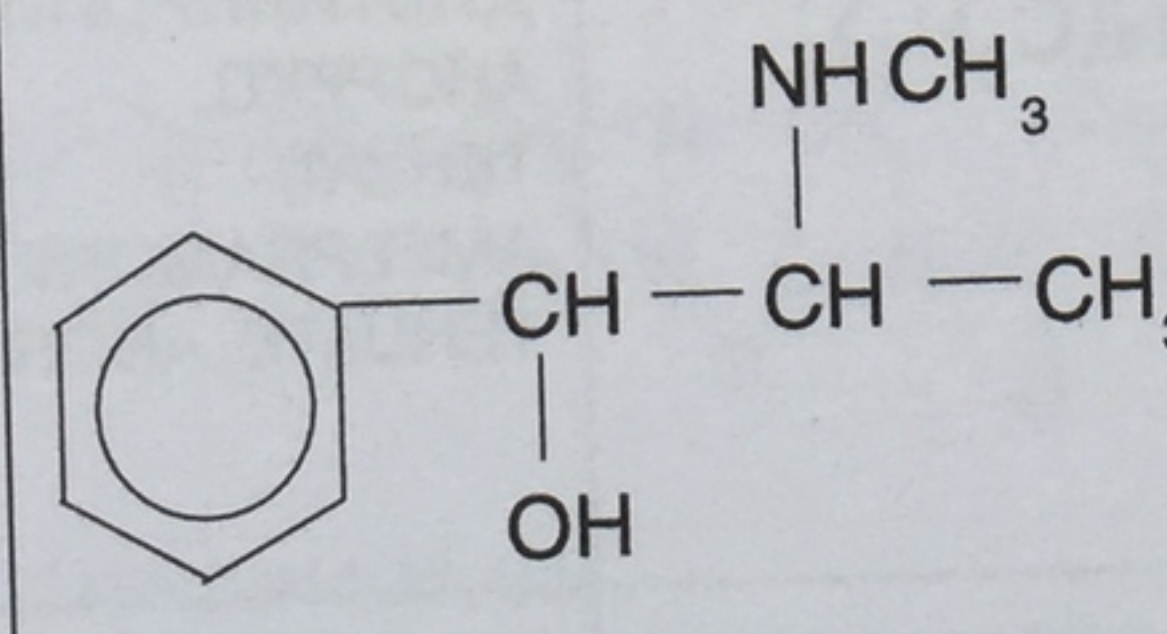
Многочисленные представители фенилалкиламинов представляют собой лекарственные средства – стимуляторы нервной системы. Среди них можно упомянуть такие распространенные лекарства, как амфетамин, эфедрин, фенилметразин, мезокарб и др. Препараты фенилметразин, мезокарб, аминорекс, пемолин, бемитил и мазиндол содержат аминогруппы в составе гетероциклических структур. Вещества метамфетамин, эфедрон и метиламинорекс запрещены к применению и изготавливаются и распространяются подпольно.

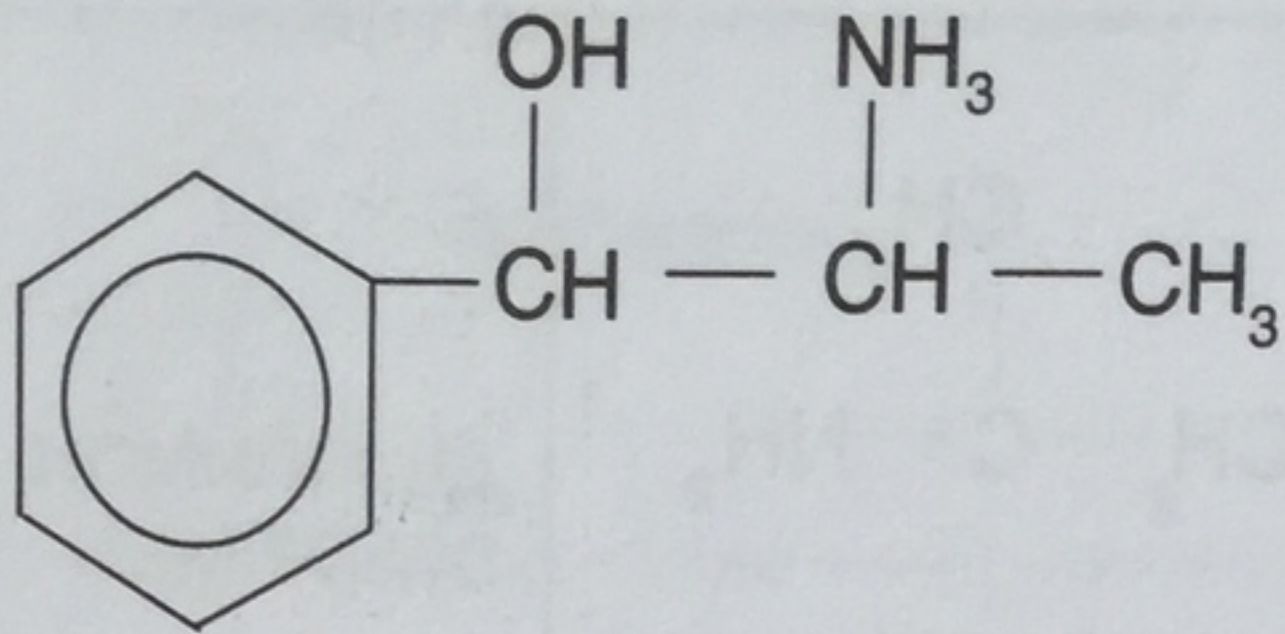
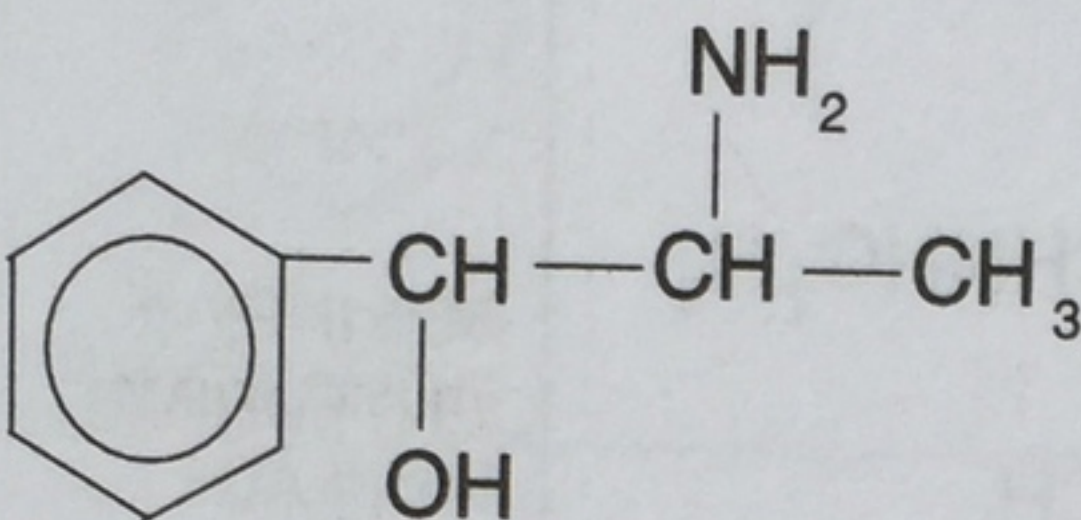
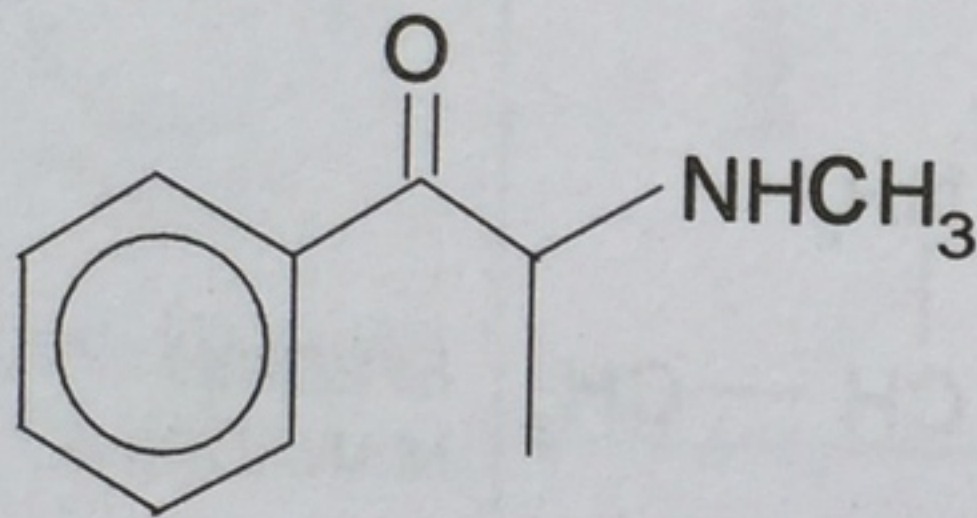
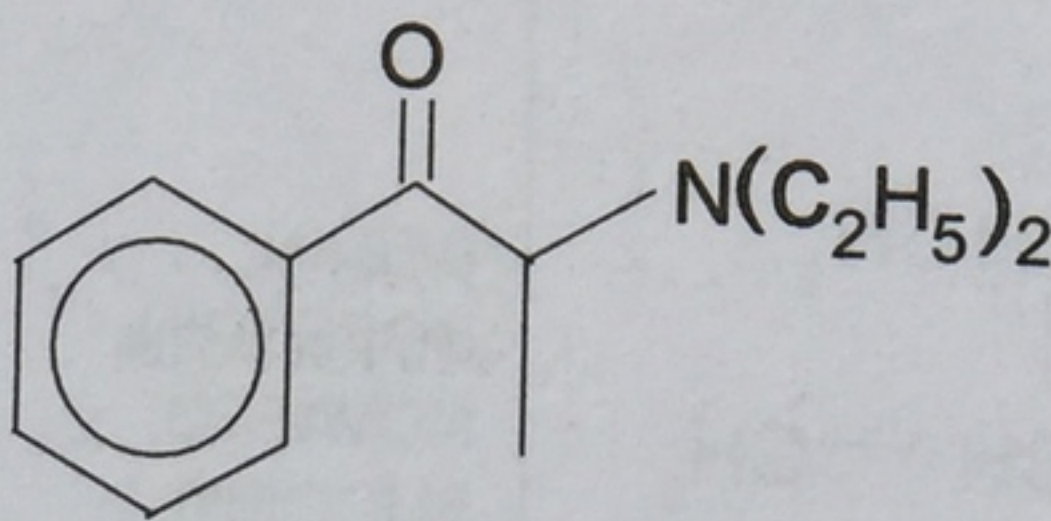
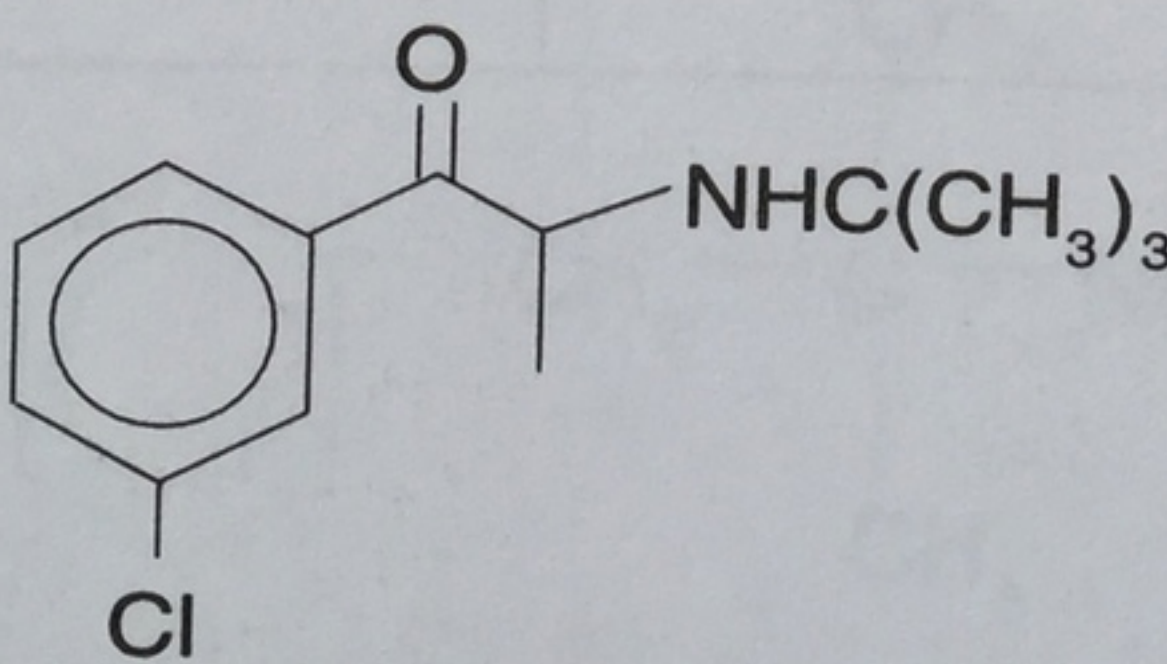
Сведения о некоторых представителях этой группы соединений, их структурные формулы, наименования, брутто-формулы и молекулярные массы приведены ниже в таблице 2.1, заимствованной из книги [1].

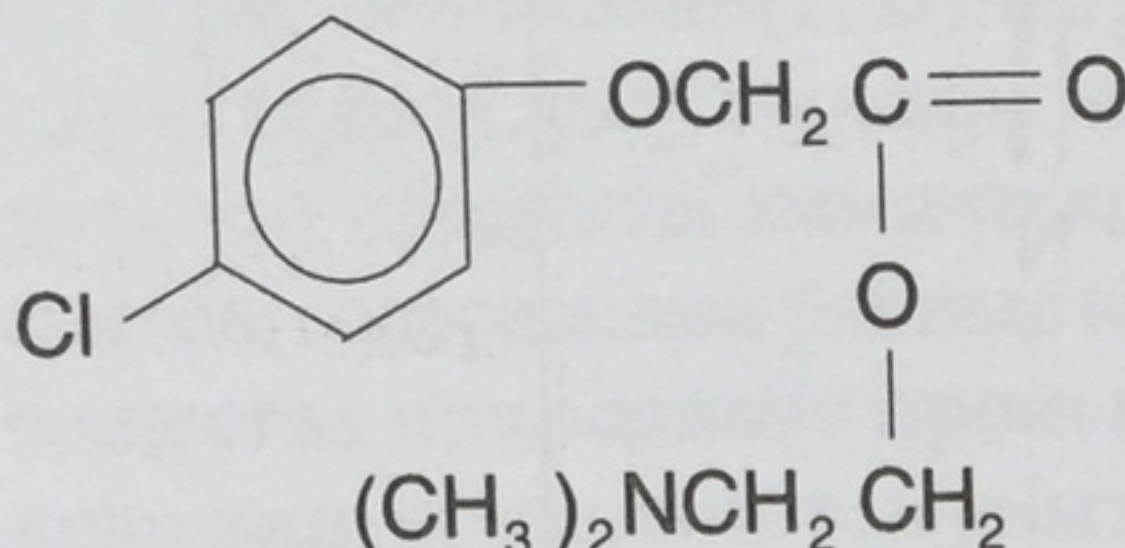
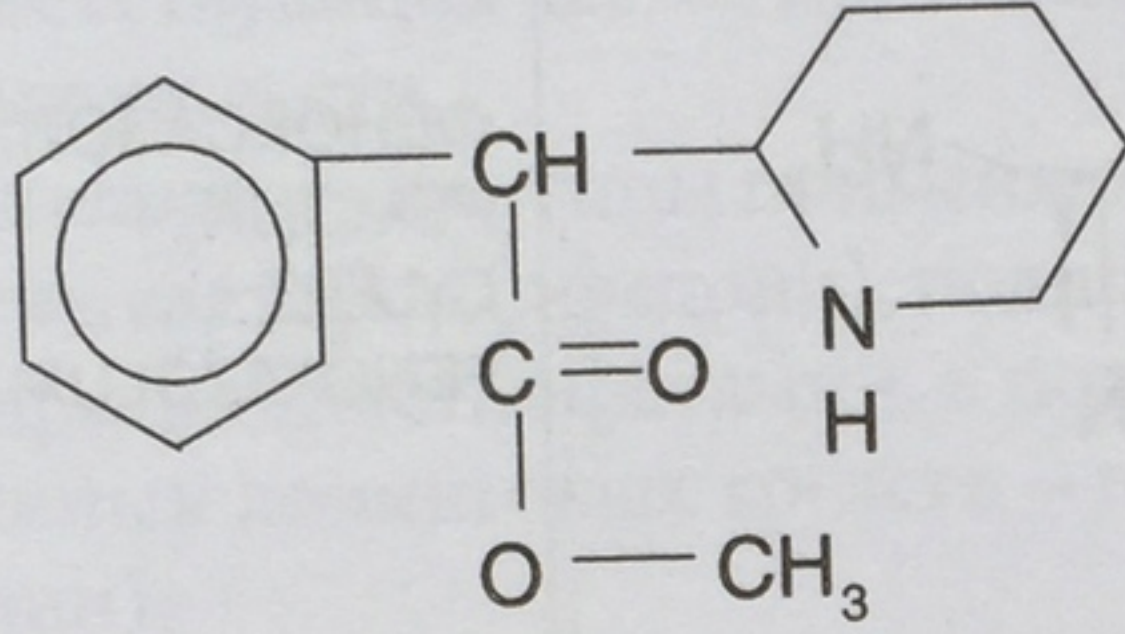
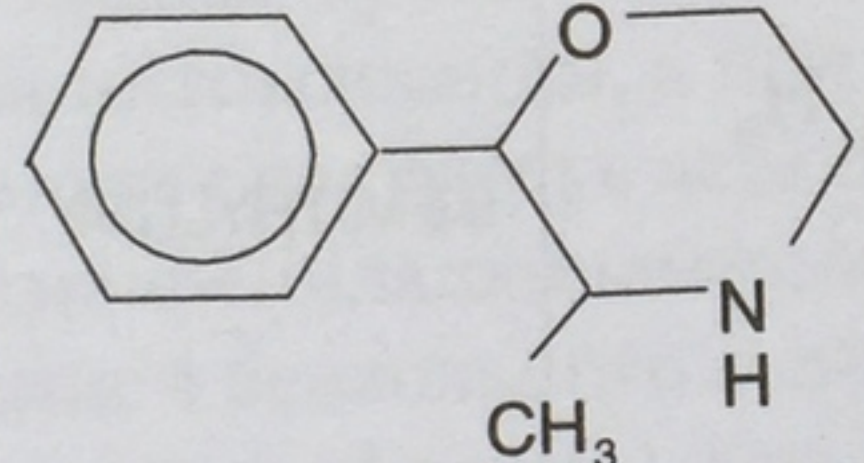
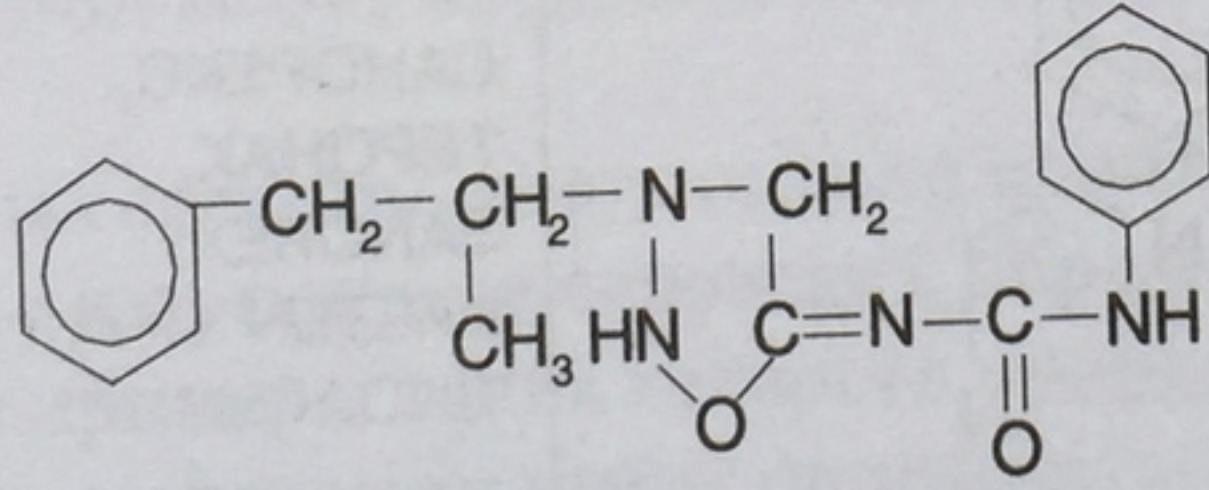
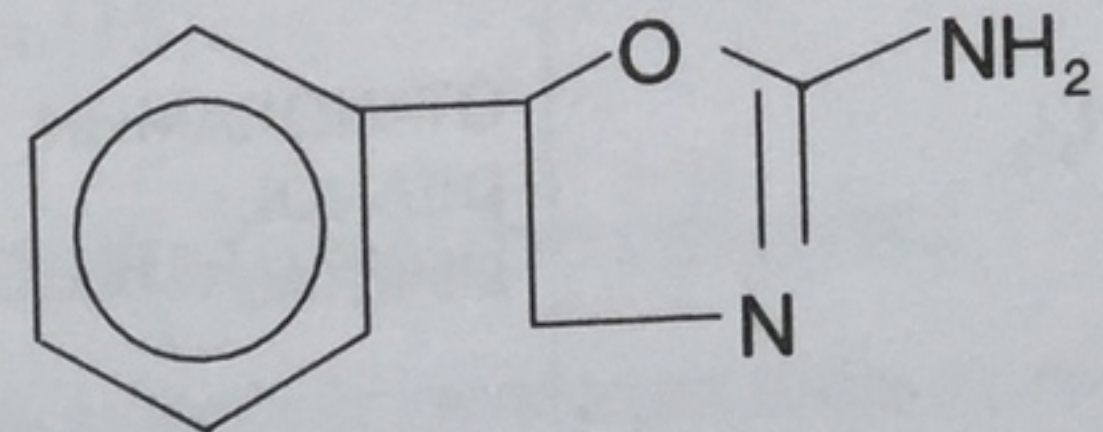
Как видно из этой таблицы, молекулярные массы представителей этой группы стимуляторов составляют от 135 до 324, что определяет возможность применения для их химико-аналитического определения таких методов, как газовая хроматография и хромато-масс-спектрометрия. Самым низкомолекулярным продуктом этой группы соединений является N,N-диметилэтаноламин (деанол), имеющий молекулярную массу 89. Тем не менее в форме оснований многие фенилалкиламины представляют собой жидкости с достаточно высокими температурами кипения (часто с разложением). В виде чистых солей соляной и серной кислот эти соединения представляют собой белые порошки или кристаллы, легко растворимые в воде и этаноле и почти нерастворимые в менее полярных растворителях (эфир, четыреххлористый углерод, хлороформ).

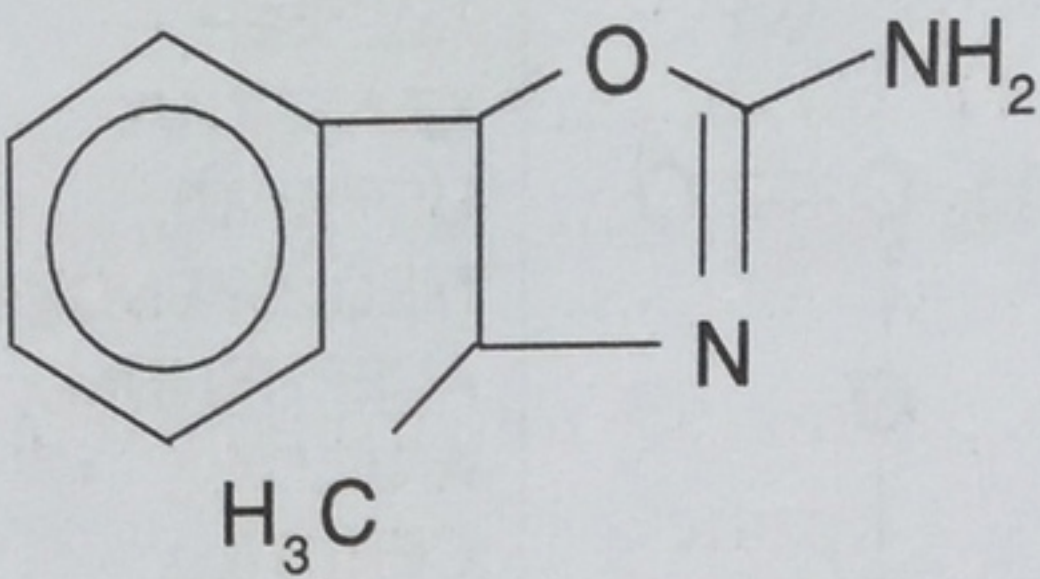
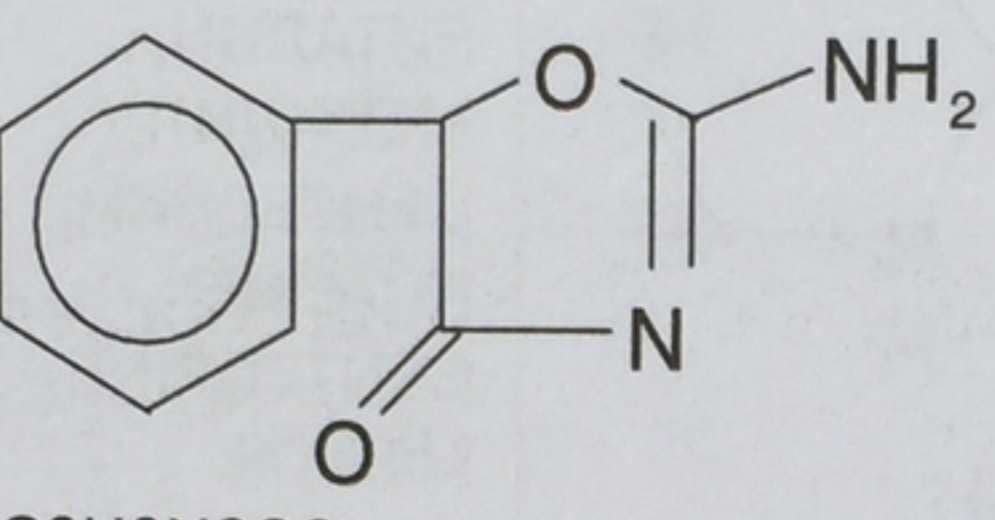
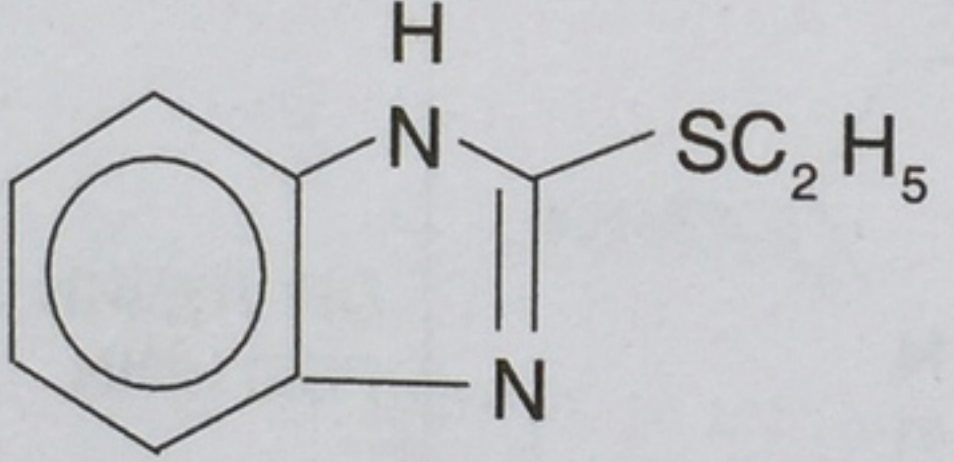
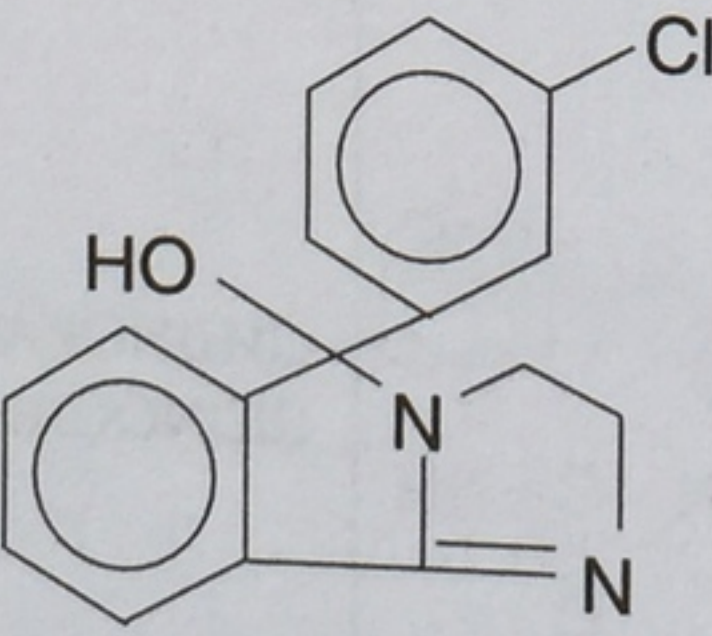
Таблица 2.1. Стимуляторы центральной нервной системы группы фенилалкиламинов

НАЗВАНИЕ лекарственного средства номер CAS	ФОРМУЛА	СИНОНИМЫ лекарственного средства	СЛЭНГ нелегального рынка
АМФЕТАМИН 300 – 62 – 9	 C ₉ H ₁₃ N, 125	BENZEDRINE ФЕНАМИН БЕНЗЕДРИН	BENNIES, B, WHITE CROSS
ДЕКСТРО – АМФЕТАМИН 51 – 64 – 9	 C ₉ H ₁₃ N, 125	DEXEDRINE, ВІРНЕТАМІН, ДЕСЕДРИН, БИФЕТАМИН (d) – АМФЕТАМИН (+) – АМФЕТАМИН (S) – АМФЕТАМИН	CADILLACS, DEXIES, BLACK, BEAUTIES
МЕТАМФЕТАМИН 537 – 46 – 2	 C ₁₀ H ₁₅ N, 149	ПЕРВИТИН, МЕТЕДРИН, ДЕЗОКСИН, PERVITIN, DESOXIN, METHEDRINE	SPEED, CRANK, UPPER, ЛЕД, ICE, METH, CRYSTALS HAWAIIAN SALT, BATU (нелегально производимый водный раствор для внутривен- ного введения) GOLD FISH, ВИНТ
ФЕНТЕРМИН 122 – 09 – 8	 C ₁₀ H ₁₅ N, 149	ФАСТИН FASTIN	

<p>Пара – ХЛОФЕНТЕРМИН</p>	 <p>C12P14ClN, 18365</p>	<p>ДЕЗОПИМОН DESOPIMON</p>	
<p>ФЕНФЛУРАМИН 458 – 24 – 2</p>	 <p>C12H16F3N, 231</p>	<p>МИНИФАЖ, ПОНДИМИН, MINIFAGE</p>	
<p>ЭФЕДРИН 299 – 42 – 3</p>	 <p>C10H15NO, 165</p>	<p>EFEDRIN MANADRINE</p>	
<p>ПСЕВДОЭФЕДРИН 90 – 82 – 4</p>	 <p>C10H15NO, 165</p>	<p>BEZAN, DOFEDRIN, NOVAFED, SUDOMYL ПСИЭФЕДРИН</p>	

<p>(-) – НОР-ЭФЕДРИН 492 – 41 – 1 (+, -) – НОР-ЭФЕДРИН 14838 – 15 – 4</p>	 <p><chem>C9H13NO</chem>, 151</p>	<p>ФЕНИЛПРОПАНО-ЛАМИН В составе многих средств</p>	
<p>НОРПСЕВДО-ЭФЕДРИН 492 – 39 – 7</p>	 <p><chem>C9H13NO</chem>, 151</p>	<p>МИРАПРОНТ MIRAPRONT</p>	
<p>ЭФЕДРОН (нелегальное изготовление)</p>	 <p><chem>C10H13NO</chem>, 163</p>	<p>МЕТАКАТИНОН МЕТИЛКАТИНОН</p>	<p>ДЖЕФ JEFF</p>
<p>ФЕПРАНОН 90 – 84 – 6</p>	 <p><chem>C13H19NO</chem>, 205</p>	<p>АМФЕПРАМОН, ДИЭТИЛПРОПИН-АНОРЕКС, ТЕНУАТ, AMFEPRAMONE TENUATE, ANOREX</p>	
<p>БУПРОПИОН 34911 – 55 – 2</p>	 <p><chem>C13H18NCIO</chem>, 239,5</p>	<p>BUPROPION</p>	

МЕКЛОКФЕНОКСАТ 51 – 68 – 3	 <chem>CCN(C)CCOC(=O)c1ccc(Cl)cc1</chem> $C_{12}H_{16}ClNO_3$, 257,5	АЦЕФЕН, КЛАРЕТИЛ, ЦЕРУТИЛ, MECLOFENOХАТ, ACERHENUM, ANALUX, CERUTIL, PROSERYL	
МЕТИЛФЕНИДАТ 113 – 45 – 1	 <chem>COC(=O)C(c1ccccc1)C2CCCCC2N</chem> $C_{14}H_{19}NO_2$, 214	РИТАЛИН, МЕРИДИЛ, ЦЕНТЕДРИН, RITALINE, CENTEDRINE, MERIDIL	
ФЕНМЕТРАЗИН 134 – 49 – 6	 <chem>CC1(C)OCCc2ccccc21</chem> $C_{11}H_{15}NO$, 177	ПРЕЛУДИН PRELUDIN	UPPER, BAM, PEACHES, HEARTS
МЕЗОКАРБ 34262 – 84 – 5	 <chem>O=C(Nc1ccccc1)C(=O)N2C(=O)N(C)CC2Cc3ccccc3</chem> $C_{18}H_{20}N_4O_2$, 324	СИДНОКАРБ SIDNOCARB	
АМИНОРЕКС 2207 – 50 – 3	 <chem>NC1=CC2C(C1)OCC2c3ccccc3</chem> $C_9H_{10}N_2O$, 162	АМИНОКСАФЕН, АПИКВИЛ, МЕНОСИЛ, AMINOХAFEN, APIQUEL, MENOCIL	

<p>МЕТИЛАМИНОРЕКС (нелегальное изготовление) 3568 – 94 – 3</p>	 <chem>C10H12N2O</chem> , 176		<p>EUPHORIA, BLUE ICE, 4-MAX, EU4EA</p>
<p>ПЕМОЛИН 3152 – 34 – 3</p>	 <chem>C9H8N2O2</chem>	<p>ФЕНОКСАЗОЛ, PEMOLIN, CYLERT, FENOXAZOLUM</p>	
<p>БЕМИТИЛ</p>	 <chem>C9H10N2S</chem> , 178	<p>BEMITHYLUM</p>	
<p>МАЗИНДОЛ 22232 – 71 – 9</p>	 <chem>C16H13ClN2O</chem> , 284,5	<p>САНОРЕКС, ТЕРОНАК, SANOREX, DASTEN</p>	
<p>ДЕАНОЛ, N, N-ДИМЕТИЛ- ЭТАНОЛ- АМИН 108 – 01 – 0</p>	<p>HO – CH₂ – CH₂ – N(CH₃)₂ <chem>C4H11NO</chem>, 89</p>	<p>ЭТАНОЛАМИН, DEANOL DINETAL</p>	

В молекулах большинства фенилалкиламинов имеются один или два асимметричных атома углерода, что определяет возможность существования левовращающей (L), правовращающей (D) и рацемической (L, D) форм этих соединений. Эти формы различаются по форме кристаллов, растворимости и по физиологической активности. Существенно отметить, что продукты химического синтеза практически всегда образуются в форме рацематов, содержащих равные количества правого и левого изомеров. С другой стороны, вещества природного происхождения всегда представляют собой одну из нескольких возможных стереоизомерных форм (природный эфедрин из эфедры представляет собой L-изомер).

Многие фенилалкиламины имеют характерные линии поглощения в УФ и ИК- спектрах. Значения соответствующих частот приведены ниже в разделе о спектральном анализе контролируемых веществ.

Некоторые соединения этой группы применяются в медицине в качестве симпатометиков и адреностимуляторов (эфедрин), подпольно используются в качестве наркотических средств (эфедрон, метамфетамин, в подпольной торговле «винт»), в спорте – в качестве запрещенных допинговых средств – психомоторных стимуляторов (амфетамин, метамфетамин).

Введенные в организм (чаще всего путем инъекций) фенилалкиламины действуют в течение 4–6 ч, однако полностью выводятся с мочой в течение 2–3 дней. Действующая концентрация их в плазме крови – 50–100 нг/мл. При содержании 200 нг/мл и выше отмечаются явления интоксикации, а при содержании амфетамина и метамфетамина порядка 40 мкг/мл может наступить летальный исход.

Пути метаболизма фенилалкиламинов в организме включают дезаминирование, окисление в положение 4 бензольного кольца (амфетамин и метамфетамин), деметилирование (метамфетамин и эфедрин), восстановление (эфедрон). Продукты окисления претерпевают конъюгацию с глюкуроновой кислотой с образованием соответствующих бензоглюкуронидов.

В большинстве случаев до 30–45% введенных в организм фенилалкиламинов выделяется с мочой в неизмененном виде.

Эфедрин и эфедрон могут выделяться неизмененными в количестве от 55 до 90%. [12–14].

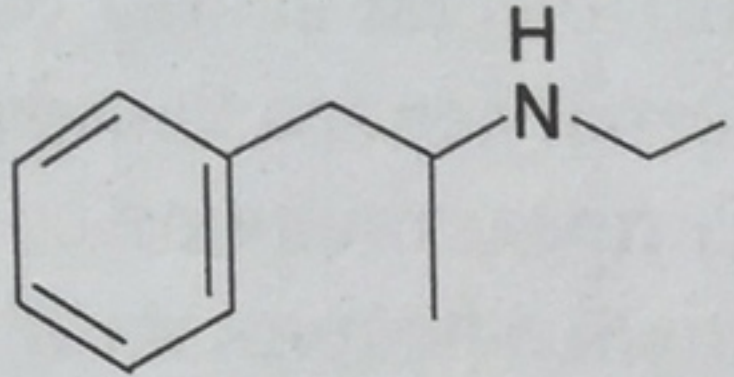
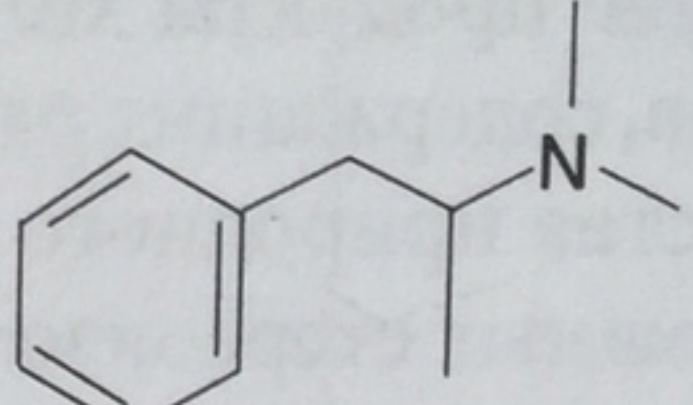
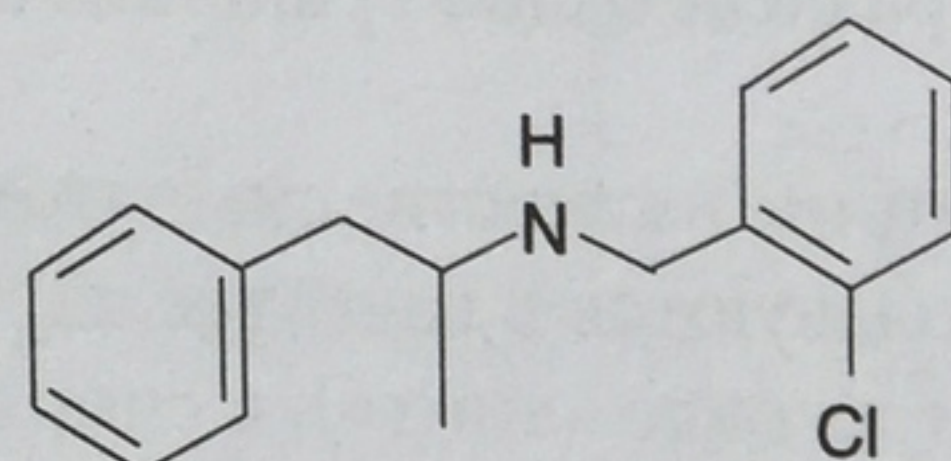
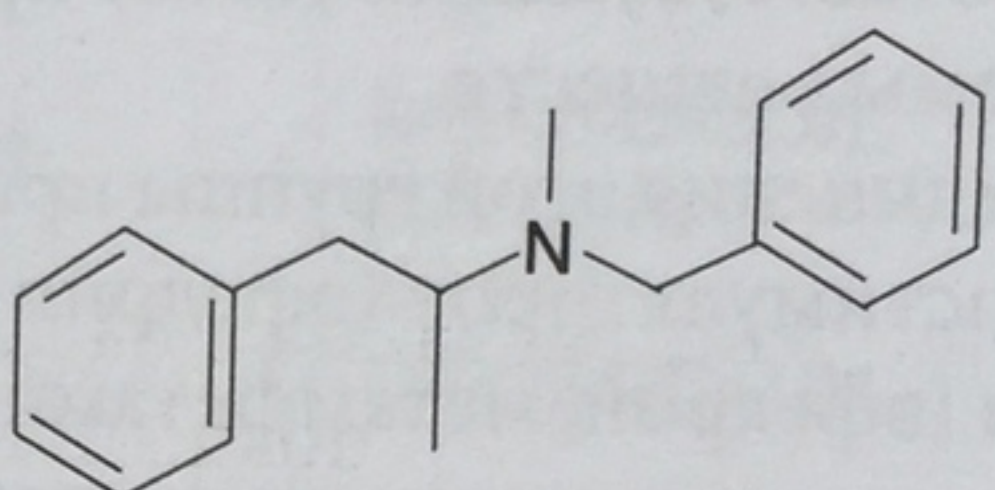
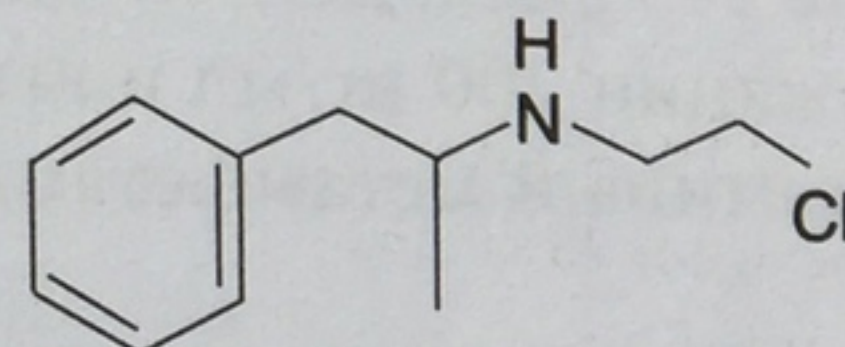
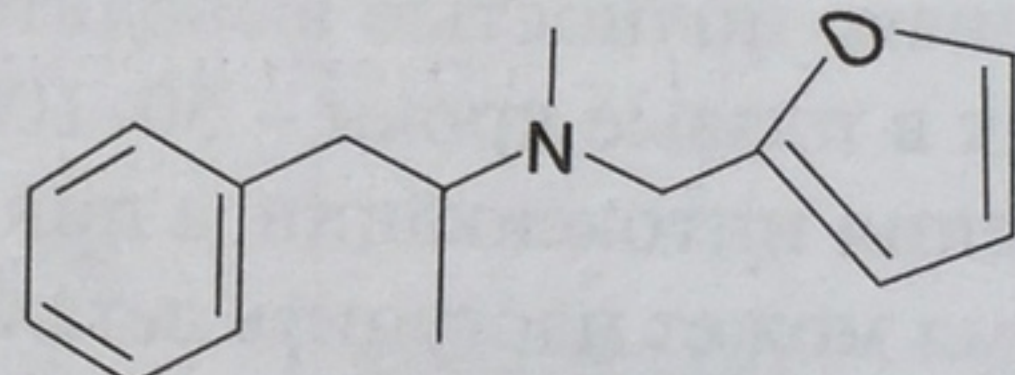
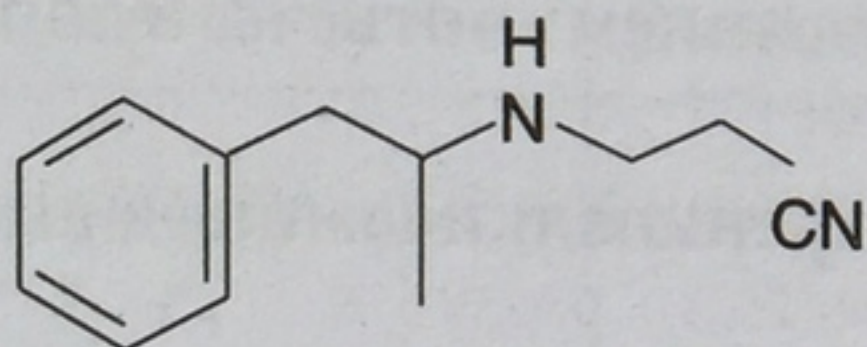
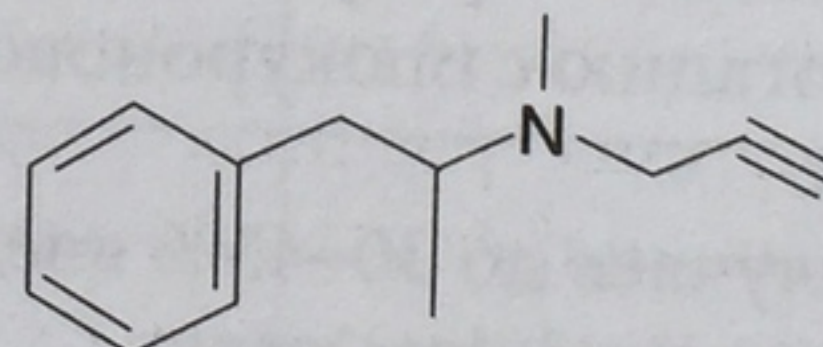
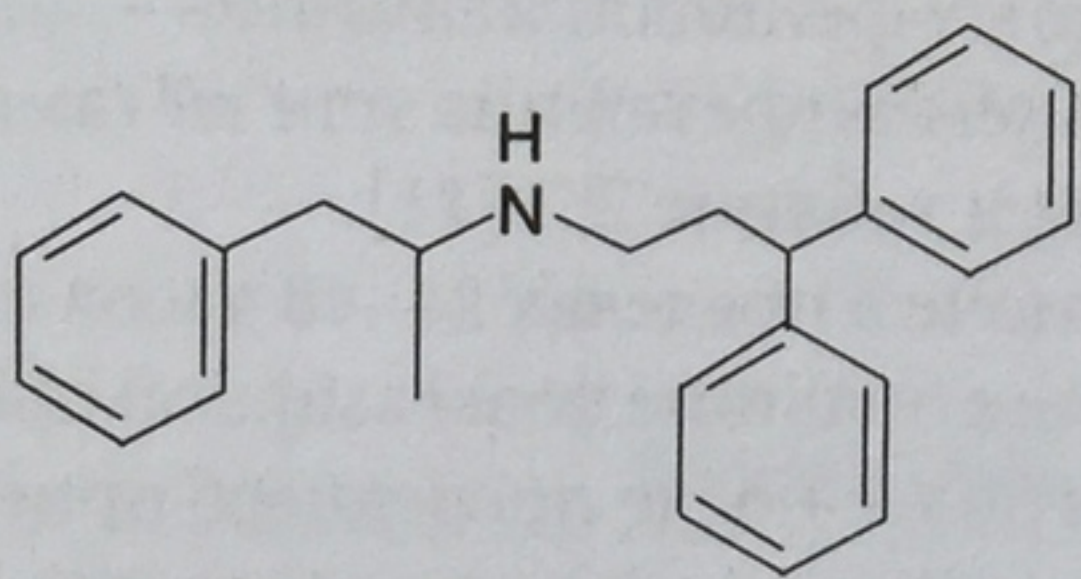
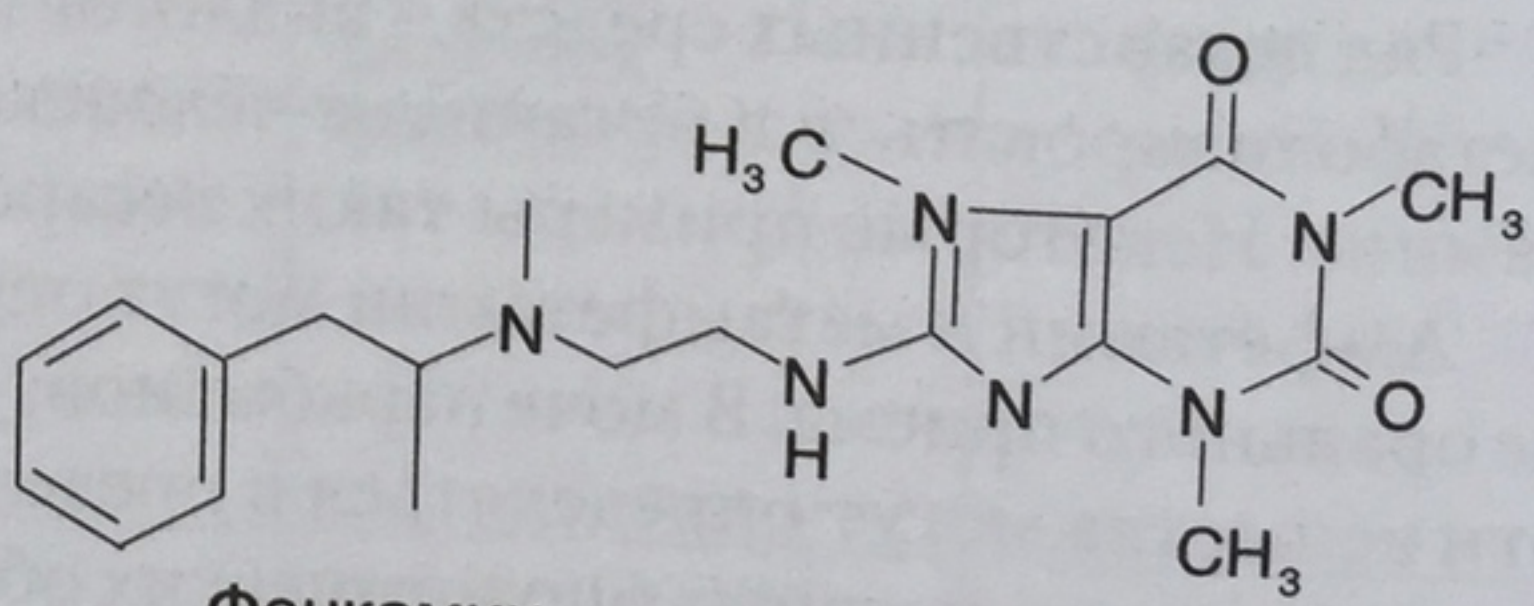
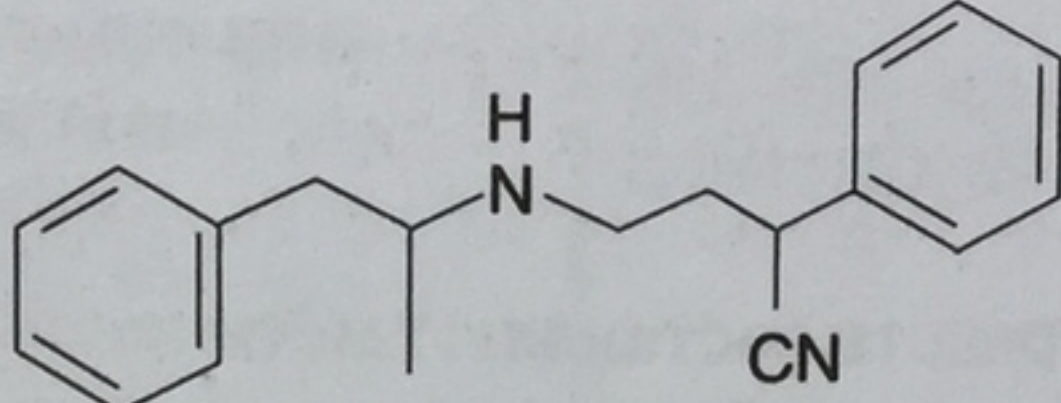
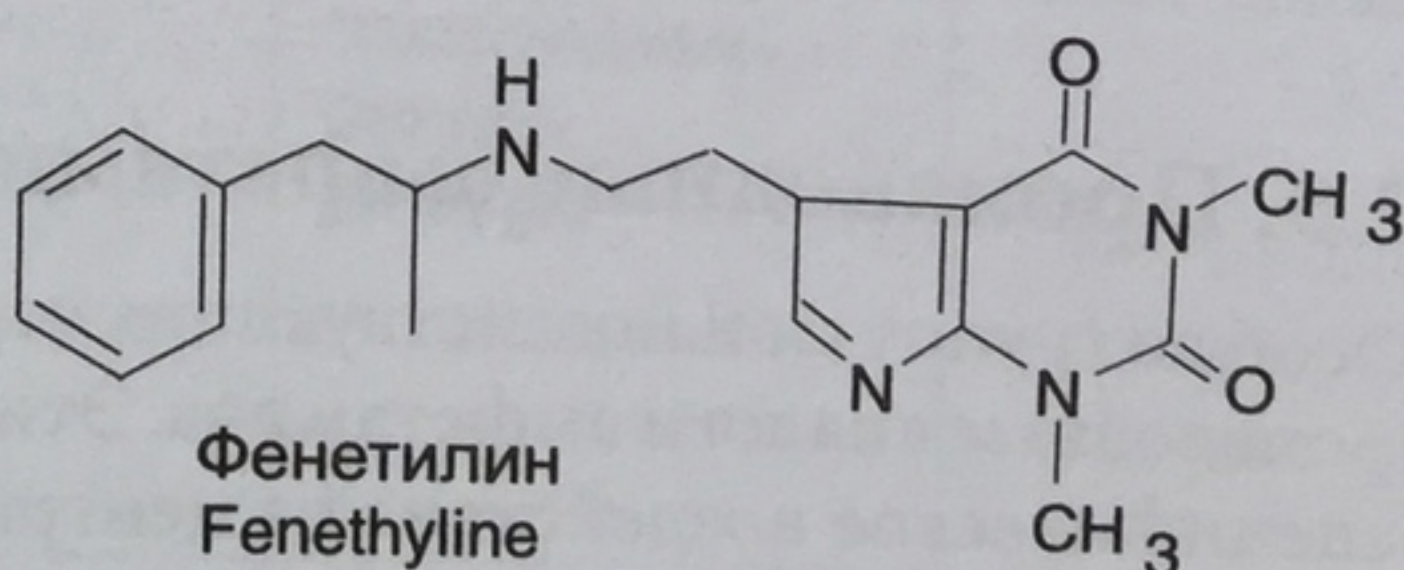
Ряд лекарственных средств – аналогов или производных фенилалкиламинов – могут метаболизироваться в организме человека с образованием амфетамина или метамфетамина. Некоторые примеры таких лекарств приведены в таблице 2.2 [11].

Амфетамин и метамфетамин могут определяться в моче в пределах 24–48 часов после орального приема. В моче наркоманов, употребляющих большие дозы амфетаминов, эти вещества могут определяться в пределах 5–7 дней и более после последнего приема. В пробах мочи и других биологических объектов при хранении их при температуре порядка -20°C концентрации амфетамина и метамфетамина практически не меняются в пределах 12 месяцев [15].

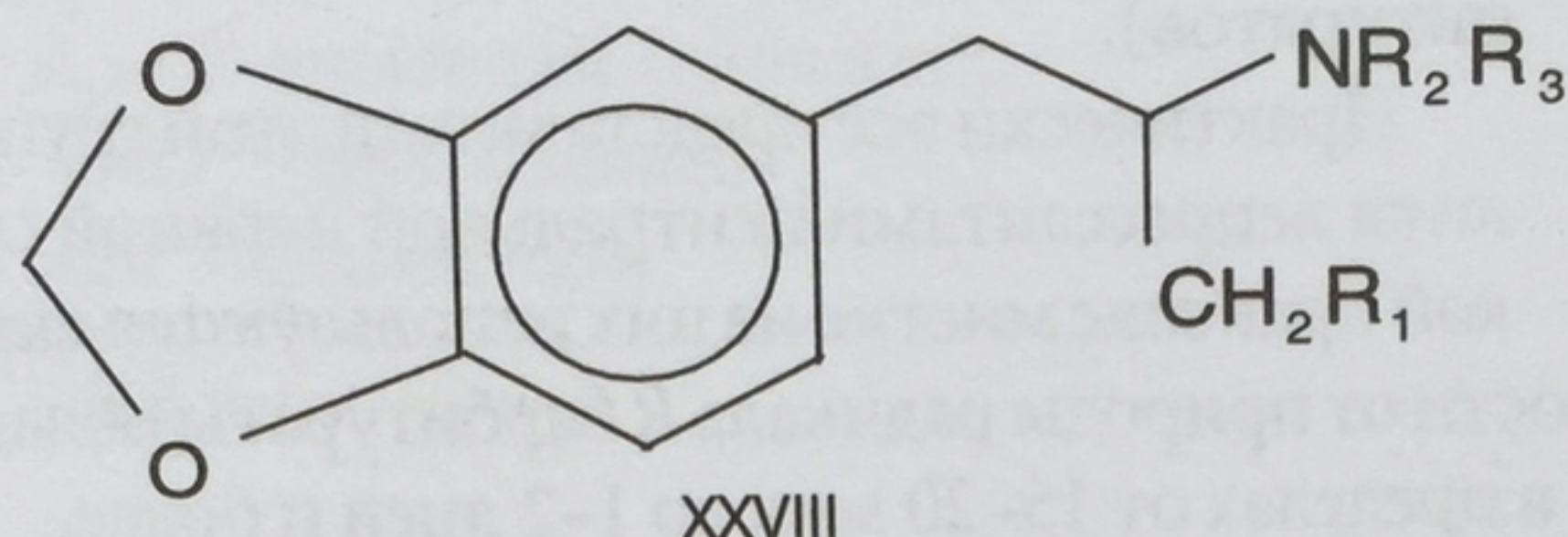
2.5. Производные амфетамина

Особую группу сильнодействующих наркотических средств составляют метилендиоксипроизводные аналоги амфетамина. Эти вещества при употреблении внутрь оказывают специфическое воздействие на центральную нервную систему. Это обстоятельство

Таблица 2.2. Лекарственные средства, метаболизирующие в организме до амфетамина и метамфетамина

Метаболит – Амфетамин	Метаболит – Метамфетамин
 <p>Этиламфетамин Etylamphetamine</p>	 <p>Диметиламфетамин Dimethylamphetamine</p>
 <p>Хлобензорекс Clobenzorex</p>	 <p>Бензфетамин Benzphetamine</p>
 <p>Мефенорекс Mefenorex</p>	 <p>Фулфенорекс Furfenorex</p>
 <p>Фенпронорекс Fenproporex</p>	 <p>Селегилин Selegiline</p>
 <p>Прениламин Prenylamine</p>	 <p>Фенкамин Fencamine</p>
 <p>Амфетаминил Amfetaminil</p>	 <p>Фенетилин Fenethyline</p>

обусловило выделение этих соединений в особую группу **энтактогенов**. Их действие на психику заключается в эйфорическом возбуждении, обострении эмоционального восприятия, повышенной потребности в духовных и физических контактах, устранении застенчивости, повышении общительности. Некоторые представители этой группы могут быть описаны общей формулой XXVIII.



В скобках приведены названия, под которыми эти вещества распространяются в подпольной торговле.

$R_1=R_2=R_3=H$
 $R_1=R_2=H; R_3=CH_3$
 $R_1=R_2=H; R_3=C_2H_5$
 $R_1=H; R_2=R_3=CH_3$
 $R_1=CH_3; R_2=R_3=H$
 $R_1=R_2=CH_3; R_3=H$
 $R_1=R_2=H; R_3=OH$

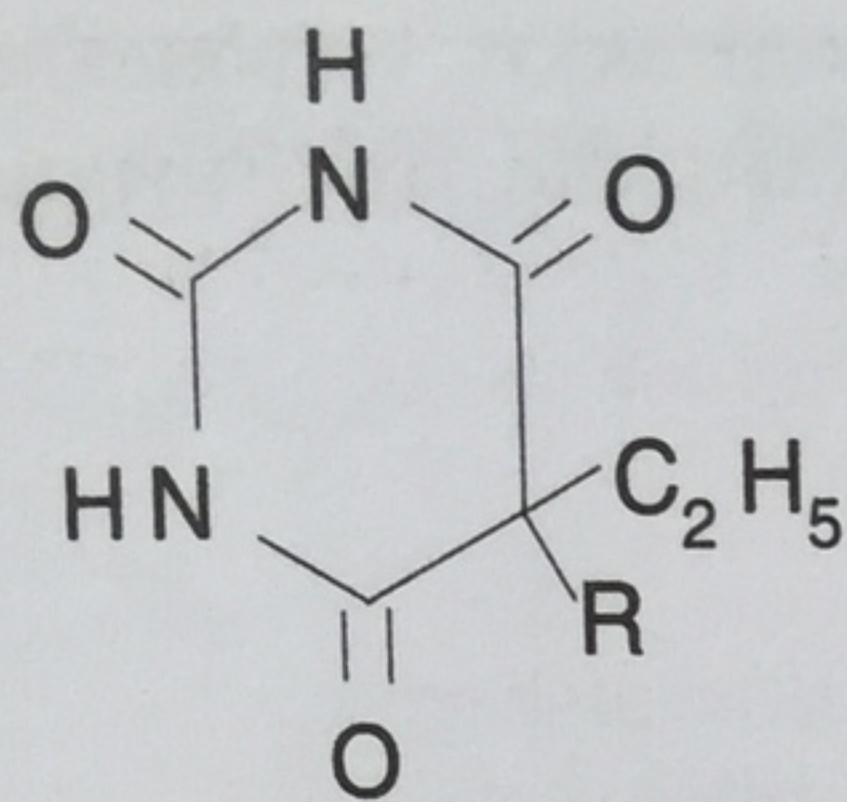
метилendioксиамфетамин (*Love Drug*);
 метилendioксиметамфетамин (*Exstasy, Adam, XTC, Essence*);
 N - этил - 3,4- метилendioксиамфетамин (*Eve*);
 N,N - диметилметилendioксиамфетамин;
 1 - (3,4 - метилendioксифенил) - 2-аминобутан;
 N - метил - 1 - (3,4-метилendioксифенил) - 2 - аминобутан;
 N - окси -3,4 - метилendioксиамфетамин (*Fantasy*).

Длительное применение этих веществ приводит к серьезным нарушениям деятельности головного мозга, длительным депрессивным и паническим состояниям, параноидным реакциям. При приеме больших доз этих наркотиков возможны смертельные исходы вследствие острой сердечной недостаточности, остановки сердца, отказа почек. После спада основных эффектов действия этих наркотиков развивается сонливость, спутанность сознания и нарушение координации, что может приводить к серьезным дорожно-транспортным происшествиям [16–18].

Все это явилось причиной того, что все эти соединения запрещены к применению как конвенцией ООН, так и законодательными актами Российской Федерации.

Молекулярные массы соединений этой группы в форме оснований лежат в диапазоне 179–207, что определяет возможность применения для их выявления газохроматографической техники. Обычно их принимают orally в дозе 50–200 мг [19, 20]. Уже через 30–40 мин после приема эти соединения обнаруживаются в плазме крови в концентрациях до 300–500 нг/мл. Полностью они выводятся из организма через 24–30 ч как в форме исходных соединений, так и в виде продуктов метаболизма. Метаболические превращения протекают, в основном, в трех направлениях: деацилирование аминной группы, окислительное дезаминирование и гидроксирование с раскрытием диоксиметиленового цикла [21]. Образующиеся оксипроизводные могут далее конъюгироваться и выводиться в форме глюкуронидов, сульфатов или замещенных гиппуровых кислот.

2.6. Производные барбитуровой кислоты



Эта обширная группа химических соединений насчитывает более 2500 различных веществ, различающихся по своему строению и по фармакологическому действию. Здесь приведена общая формула производных барбитуровой кислоты (барбитуратов).

Практически все представители этой группы соединений являются депрессантами центральной нервной системы. В медицинской практике многие из них используются как седативно-снотворные средства.

В зависимости от природы радикала R барбитураты обладают более или менее длительным действием в пределах от 15–20 мин до 1–2 дней и более.

В России наиболее часто отмечаются случаи злоупотребления барбиталом ($R = C_2H_5$), фенobarбиталом ($R = C_6H_5$), циклобарбиталом ($R =$ —циклогексильный радикал), циклогексенил-1), барбамилом ($R = -CH_2CH_2CH(CH_3)_2$) и этаминалом ($R = -CH(CH_3)C_3H_7$), обычно в форме натриевых солей.

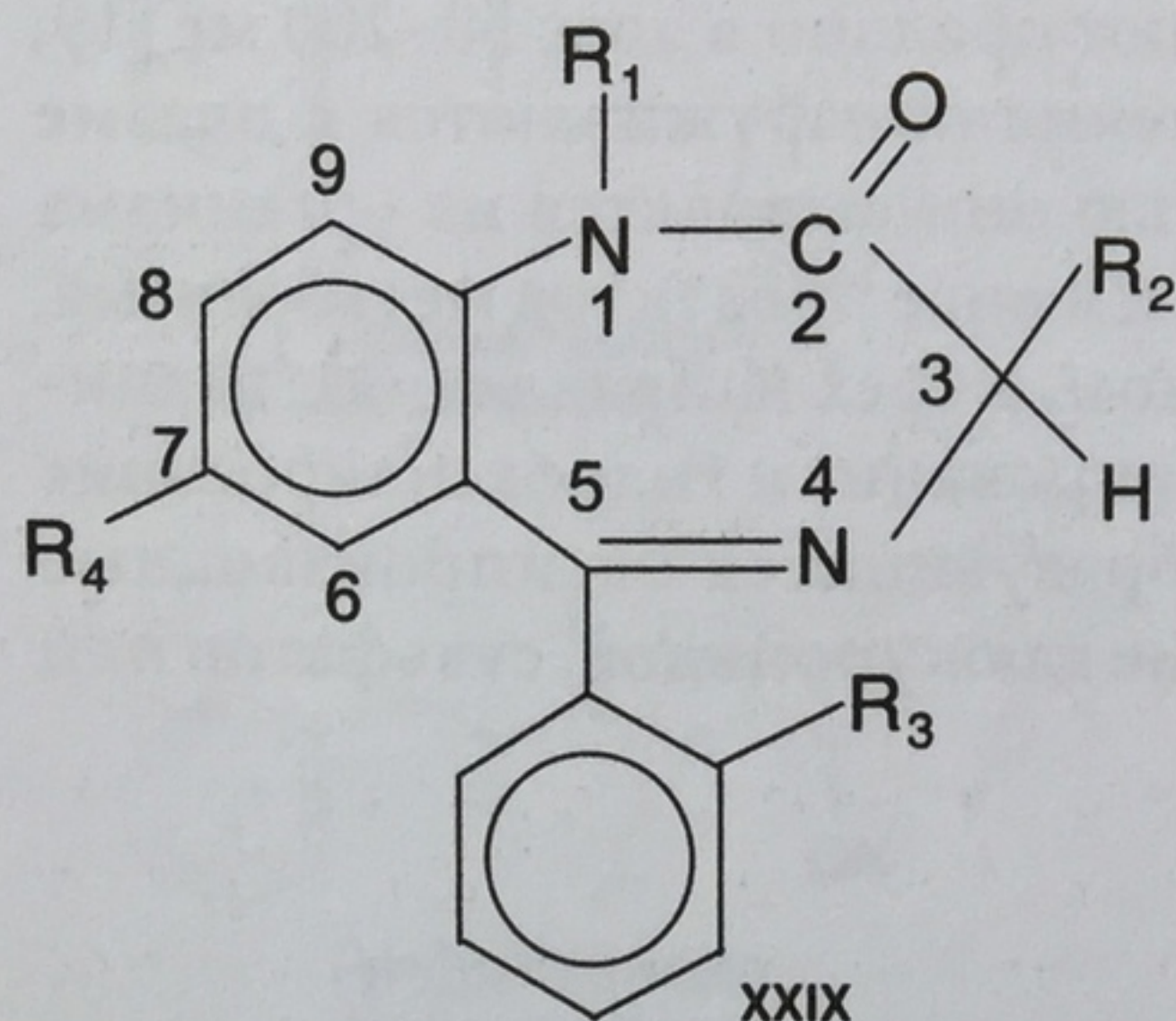
Все барбитураты плохо растворимы в воде, но хорошо растворяются в водных растворах щелочей с образованием солей, что определяет их быстрое всасывание в желудочно-кишечном тракте.

Барбитал и сходные с ним препараты пролонгированного действия выводятся из организма в основном с мочой в неизменном виде, причем половина введенного количества экскретируется за 4 дня, а остаточные количества могут быть зафиксированы в течение 15–16 дней.

Фенобарбитал выводится с мочой в форме N -глюкопиранозида исходной формы, и в форме конъюгата с глюкуроновой кислотой его метаболита 4-оксифенобарбитала.

Основными направлениями метаболизма барбамила и этаминала натрия являются окисление 3'-углеродного атома алкильного заместителя до оксипроизводных, далее до кетогруппы и затем до карбоксильной группы. Возможно также окисление до N -оксипроизводных по азотным атомам цикла. Сходным образом циклобарбитал окисляется до 3'-кетоциклобарбитала. В неизменном виде с мочой выводится менее 10% введенной в организм дозы [22].

2.7. Производные 1,4-бензодиазепина



Бензодиазепины представляют собой обширную группу биологически активных соединений, в составе которой насчитывается более 100 наименований лекарственных препаратов и более 2000 веществ, обладающих седативными свойствами. В эту группу веществ входят производные 1,4-бензодиазепина (правильнее: бензо-1,4-дiazепина), а также соединения из групп 1,5-бензодиазепинов и 2,3-бензодиазепинов. Многие из этих веществ представляют собой транквилизаторы с высокой активностью, малой токсичностью и широким спектром терапевтического действия.

Многочисленные случаи неоправданного применения соединений данной группы явились причиной отнесения их к веществам, требующим международного контроля, что было сделано Комиссией ООН по наркотикам в 1984 году.

Химические структуры наиболее распространенных бензодиазепинов отвечают формуле XXIX:

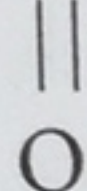
$R_1=R_3=H$; $R_2=OH$; $R_4=Cl$ – оксазепам (нозепам);

$R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=Cl$ – диазепам (сибазон);

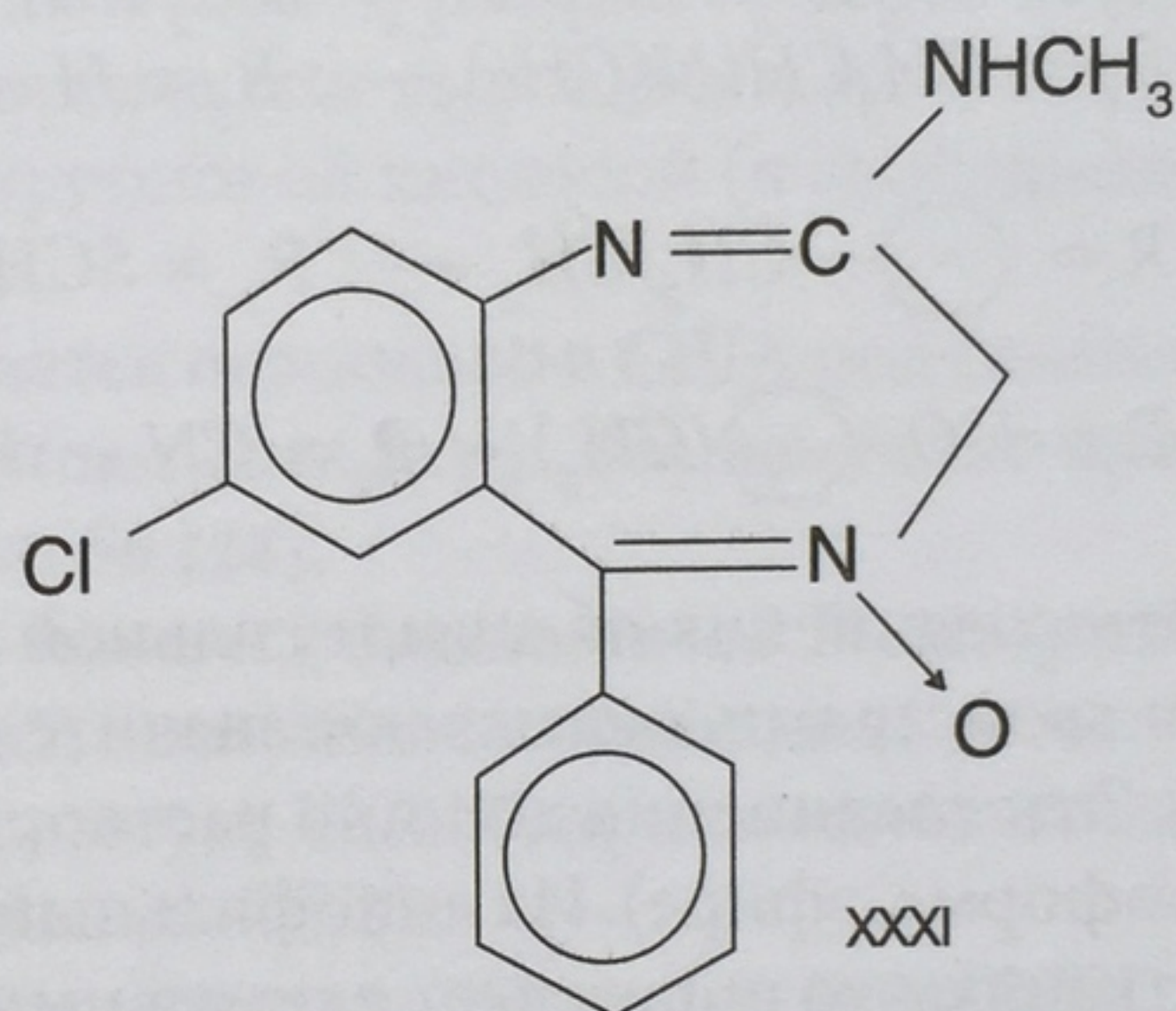
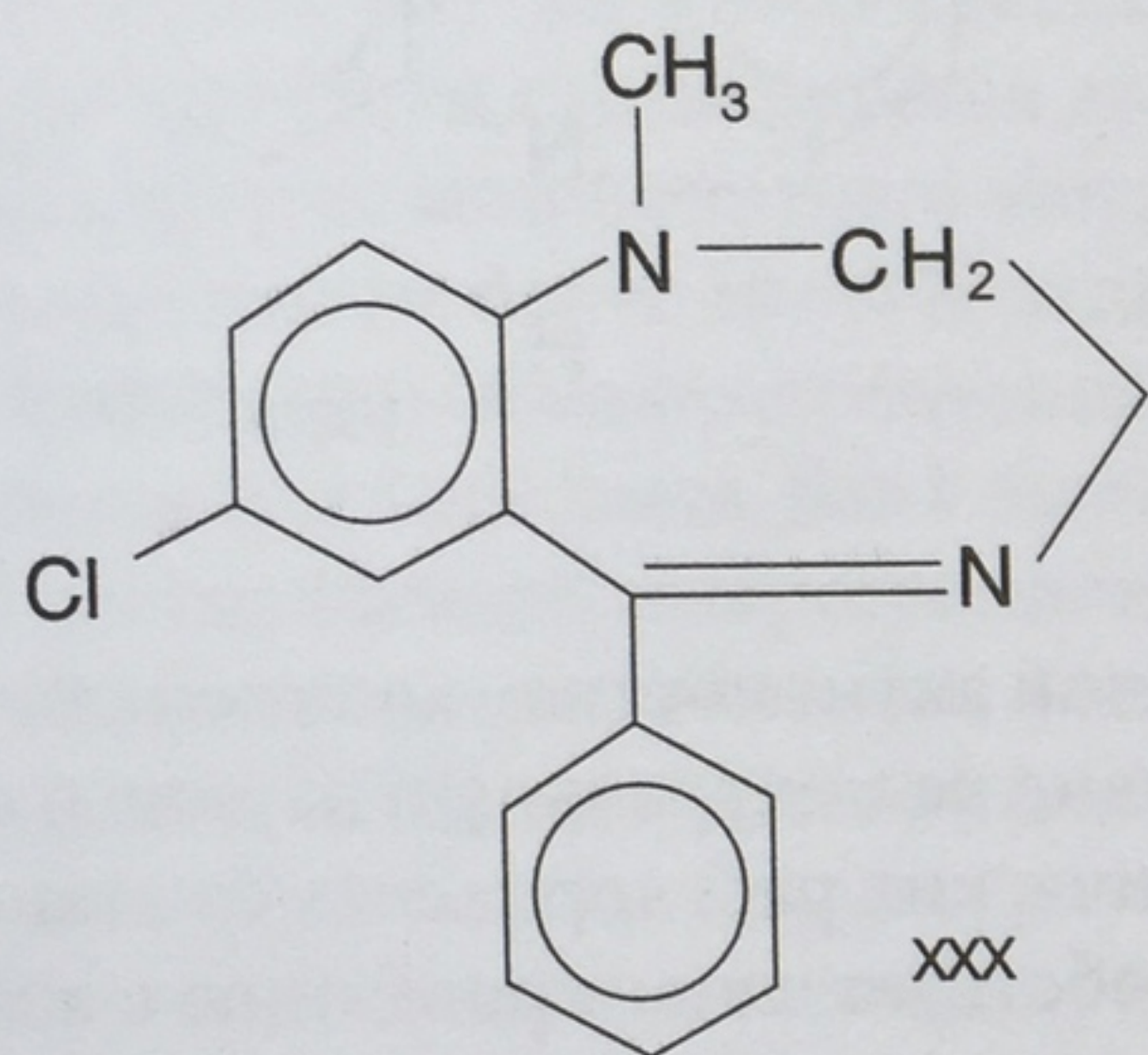
$R_1=R_2=H$; $R_3=Cl$; $R_4=NO_2$ – нитразепам;

$R_1=R_2=H$; $R_3=Cl$; $R_4=Br$ – феназепам;

$R_1=CH_2-C(=O)-NHNH_2$;



$R_2=R_3=H$; $R_4=Br$ – гидазепам



Распространенные транквилизаторы медазепам (мезапам) и хлордiazепоксид (хлорзепид) имеют структуры XXX и XXXI, соответственно:

Соединения группы 1,4-бензодиазепина в кислой среде легко гидролизуются при нагревании по амидной связи 1–2 и по иминной связи 4–5 с образованием соответствующих бензофенонов, несущих в положении 5 хлор-, бром- или нитрогруппу, и достаточно уверенно идентифицируемых в биологических образцах.

В форме оснований соединения этой группы плохо растворяются в воде и лучше – в органических растворителях (этаноле, хлороформе, диэтиловом эфире).

В водных растворах при низких значениях pH бензодиазепины гидролизуются по связям NC с образованием соответствующих алкилзамещенных бензофенонов, имеющих желтую окраску.

В биологических объектах бензодиазепины в общем достаточно стабильны при низких температурах, сохраняясь в течение 20–30 дней при 4° С и до одного года при – 20° С. В организме человека бензодиазепины накапливаются в жировых тканях и из них выделяются в кровь. Это обеспечивает полупериод их выведения от 8 до 40 часов. Из организма до 60% бензодиазепинов выделяются с мочой, часто в форме конъюгатов с глюкуроновой кислотой, а остальное – через пищеварительный тракт. Метаболические трансформации бензодиазепинов включают деметилирование метиламиногрупп, окисление по углероду в положении 3 и образование конъюгатов с глюкуроновой кислотой по гидроксильной группе у C₃. Нитрогруппа в нитразепаме восстанавливается до аминогруппы, по которой далее образуется амид с уксусной кислотой. Гидразепам в процес-

се метаболических превращений теряет заместитель при атоме азота в положении 1 и превращается в бромный аналог хлосепада. Одновременно может протекать окисление при атоме C_3 с последующим образованием глюкуронида по гидроксильной группе.

2.8. Производные фенотиазина

Среди этой достаточно многочисленной группы соединений, имеющих общую формулу XXXII, наиболее часто встречаются следующие лекарственные соединения: **аминазин**, **дипразин**, **левопромазин**, **тиоридазин**.

$R_1 = (CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2-$; $R_2 = Cl$ – аминазин;

$R_1 = (CH_3)_2NCH_2CH(CH_3)CH_2-$; $R_2 = OCH_3$ – левопромазин;

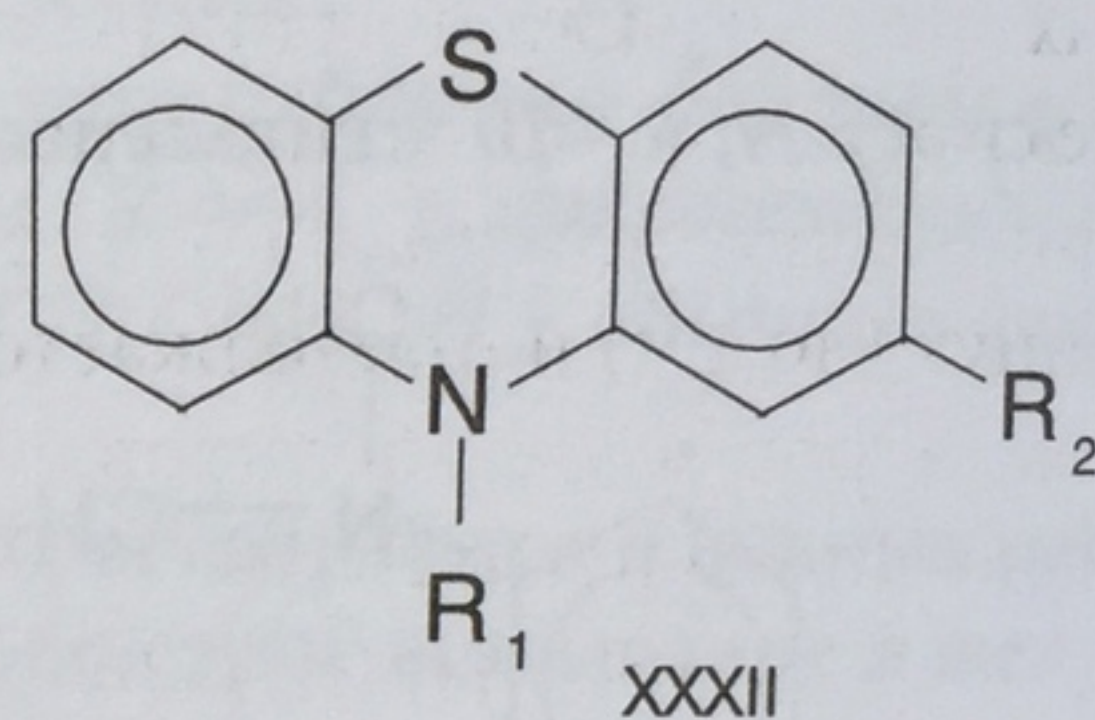
$R_1 = (CH_3)_2CH_2CH_2-$; $R_2 = H$ – этизин;

$R_1 = (C_2H_5)_2NCH_2CH_2-$; $R_2 = H$ – динезин;

$R_1 = CH_3CH(N(CH_3)_2)-$; $R_2 = H$ – дипразин;

$R_1 = \text{цикл.}-(CH_2)_2-$; $R_2 = SCH_3$ – тиоридазин;

$R_1 = HO-\text{цикл.}-(CH_2)_3-$; $R_2 = CN$ – перециазин.



Эти соединения обладают сильной антигистаминной активностью, холинолитическими свойствами, оказывают значительное воздействие на центральную нервную систему. Эти соединения хорошо растворяются в органических растворителях (в этаноле, хлороформе, эфире). Их липофильный характер способствует депонированию в жировых тканях, что определяет длительный период их выведения из организма. В основном, эти продукты выводятся из организма с мочой, главным образом в метаболизированных формах. Основные направления метаболизма – окислительные реакции по атому серы с образованием гидроксильных групп, N-деалкилирование, конъюгация с глюкуроновой кислотой.

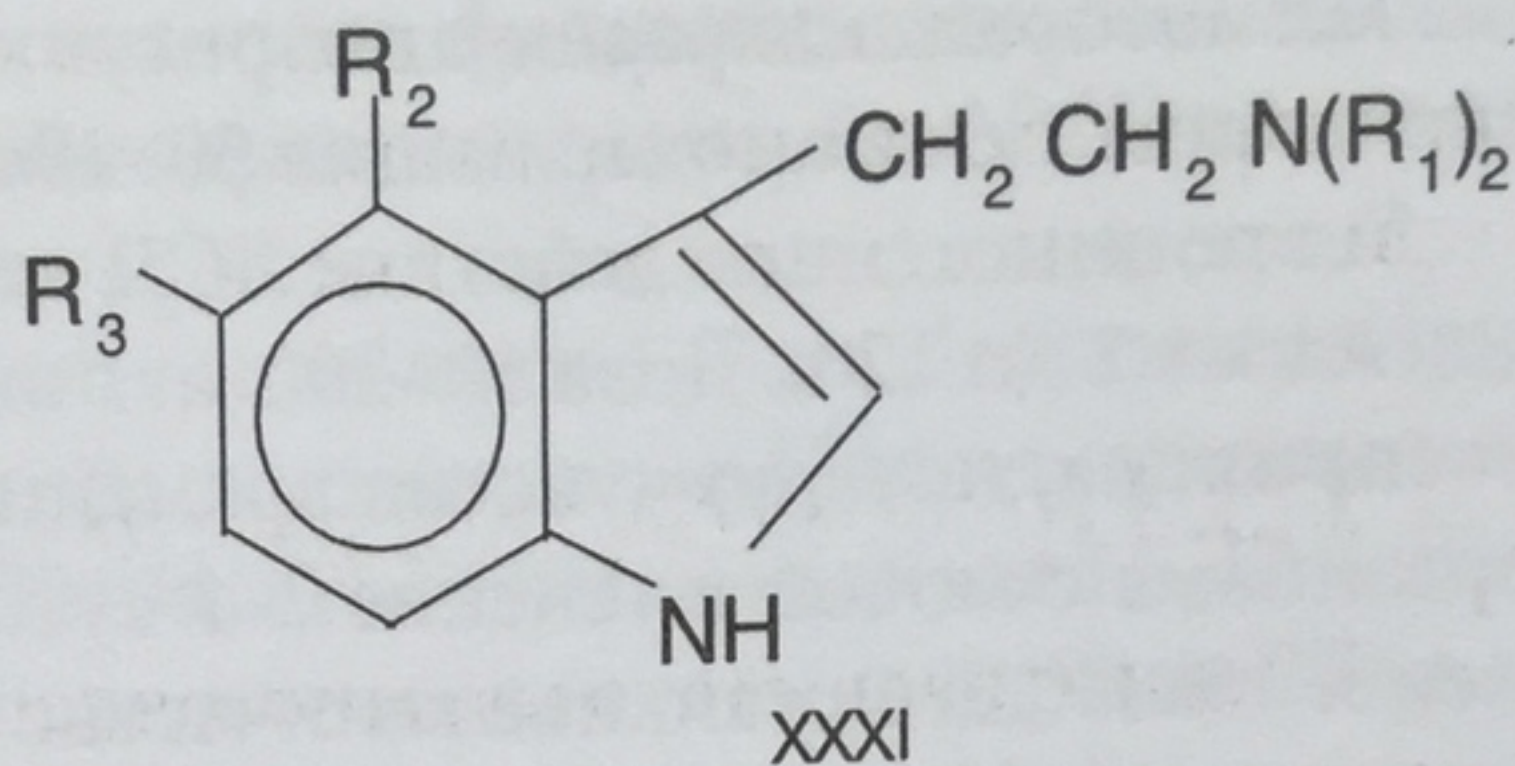
2.9. Галлюциногены

Галлюциногены – это общее название группы веществ, вызывающих возбуждение центральной нервной системы, приводящее к нарушениям в восприятии действительности, в частности к искажению восприятия цветов, световых сигналов, запахов, вкусовых ощущений, оценок пространственных и временных соотношений. Прием галлюциногенов приводит обычно к эйфорическим состояниям, однако может способствовать развитию депрессий и агрессивных состояний. Эти явления могут принимать столь сильные формы, что могут приводить к самоубийствам.

По способу воздействия на организм галлюциногены делятся на две группы: **серотонинэргические вещества** (ЛСД, мескалин, псилоцин, псилоцибин) и **диссоциативные анестетики** (фенциклидин, его аналоги, включая кетамин). Соединения первой группы влияют на обмен серотонина в мозге. Вещества второй группы воздействуют на глутаминэргические рецепторы.

По химической структуре многие галлюциногены являются производными триптамина (3-этиламинобензопиррола). Их строение описывается общей формулой XXXII:

$R_1=R_2=R_3=H$ – триптамин;
 $R_1=R_2=H$; $R_3=OH$ – серотонин;
 $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$ – N ,
 N -диметилтриптамин;
 $R_1=CH_3$; $R_2=H$; $R_3=OH$ – буфотенин;
 $R_1=CH_3$; $R_2=OH$; $R_3=H$ – псилоцин;
 $R_1=CH_3$; $R_2=OP(=O)(OH)_2$; $R_3=H$ –
 псилоцибин.



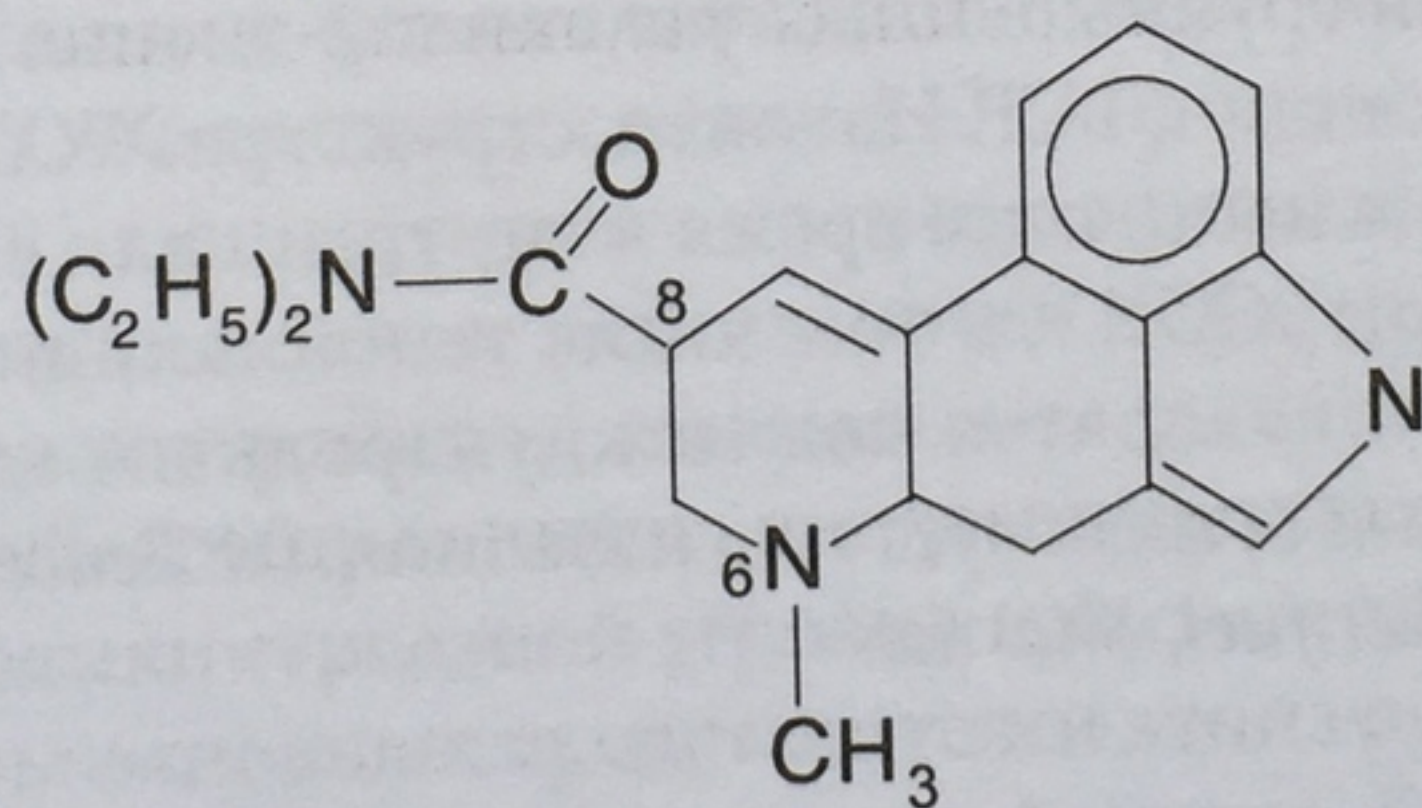
Среди этих соединений активными галлюциногенами, применяемыми, в основном, путем орального приема, являются псилоцин и псилоцибин, содержащиеся в некоторых грибах (*Psilocybe*, *Panaeolina*, *Pluteus*, *Tropharia* и др.) [23]. Употребление этих наркотических средств распространено, в частности, в северных регионах России. Псилоцибин также синтезируют в подпольных лабораториях. В форме чистых препаратов эти вещества принимают внутрь в количествах 6–10 мг. Их действие проявляется через несколько минут (до 1 ч) и продолжается до 4–6 ч. Из организма они выводятся с мочой, в основном, в форме метаболитов и конъюгатов с глюкуроновой кислотой (в свободном виде выделяются не более 10–11% этих соединений).

Буфотенин (изомер псилоцина) распространяется подпольно в США под слэнговыми названиями *Love Stone*, *Black Stone*, *Hard Rock*, *Chinese Love Stone*. Это вещество входит в состав китайского лекарственного средства *Chan Su* [24].

Исключительно сильным галлюциногеном является диэтиламид *D*-лизергиновой кислоты (ЛСД), получаемый из соответствующей кислоты, выделяемой из рожков спорыньи (*Ergot fungus*). Структура ЛСД отвечает формуле XXXIII, причем диэтиламидная группа при C_8 занимает экваториальную позицию (d-ЛСД).

Изомер, содержащий диэтиламидную группу в аксиальной позиции (изо-ЛСД), фармакологически неактивен.

В нелегальной продаже этот препарат распространяется под названиями *Acid*, *Blotter*



диэтиламид-*d*-лизергиновой кислоты ЛСД
XXXIII

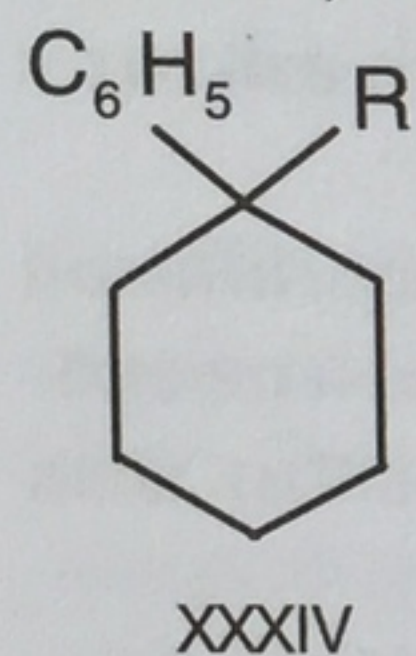
Acid, *Microdot*, *White Lightning* в различных формах, которые готовятся путем нанесения растворов ЛСД на разнообразные сорбирующие носители (сахар, фильтровальная бумага, различные порошки, расфасованные в желатиновые капсулы). Применяются также препараты ЛСД в форме кусочков затвердевшего желатина («пирамидки») или таблеток различного размера, формы и окраски, содержащих от 50 до 100 мкг ЛСД. В подпольной продаже распространены также формы ЛСД в виде пропитанных бумажных листов, перфорированных на участки, содержащие типичные дозы в 30–50 мкг («марки»). Часто на этих

листах изображены различные рисунки. Распространены также миниатюрные таблетки диаметром 1,6 мм, содержащие 50–100 мкг ЛСД («Микродот») [26].

Галлюциногенное действие ЛСД начинается через 30–90 мин после приема внутрь и длится от 2 до 12 ч. Доза 50–200 мкг вызывает интенсивные галлюцинации, изменения восприятия, потерю чувства времени и направления. В основном, ЛСД выводится из организма с мочой в течение 2–3 суток, причем в неизменном виде экскретируется менее 1% ЛСД. Остальное количество выводится в форме метаболитов и конъюгатов с глюкуроновой кислотой [27]. Основные направления метаболизма – окисление в различных позициях (2-, 3-, 13-, 14-), деалкилирование метиламиногруппы в положении 6 и диметиламидной группы в положении 8. Вследствие чрезвычайно высокой активности ЛСД химико-аналитическое выявление этого вещества и продуктов его метаболизма в биологических объектах достаточно затруднительно. В ряде случаев его концентрация измеряется несколькими нанограммами на 1 г субстрата [28].

2.10. Фенциклидин и его аналоги

Группу диссоциативных анестетических галлюциногенов составляют 1-(1-фенилциклогексил)-пиперидин, называемый также **фенциклидином** (PCP) и его многочисленные аналоги [29–32]. В их число входит и достаточно широко применяемый в медицинской практике внутривенный анестетик кетамин (калипсол). Структурные формулы некоторых представителей этой группы веществ приведены ниже.



$R = N$ -пиперидин – фенциклидин, РСР;

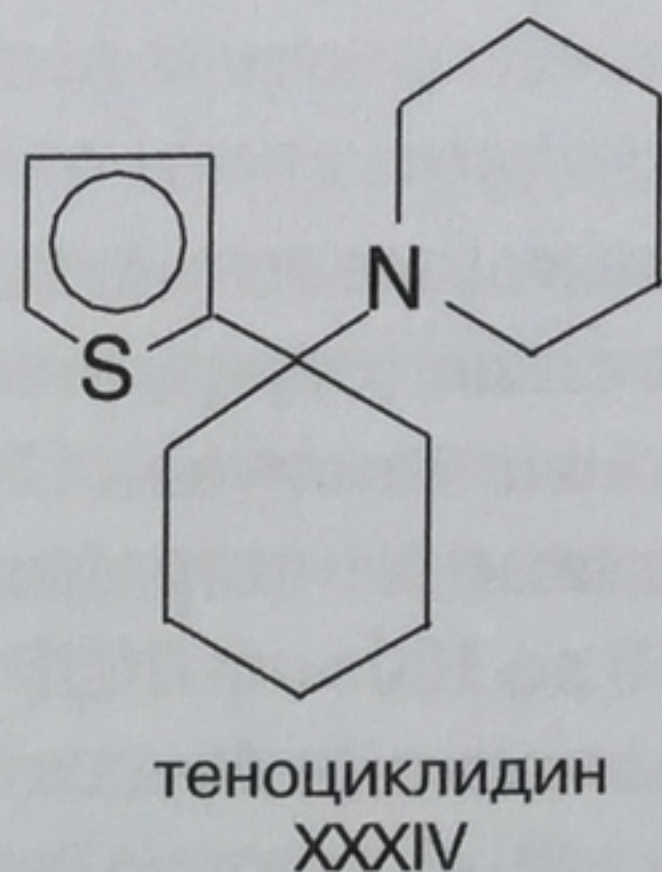
$R = N$ -пирролидин – ролициклидин, РСРy, РНР;

$R = C_2H_5NH$ — этициклидин, РСЕ;

$R = (C_2H_5)_2N$ – фенилциклогексилдиэтиламин.

Если вместо фенильной группы в молекуле стоит 2-тиенил (формула XXXIV), то препарат называется теноциклидин, ТСР. Наконец, структура XXXV отвечает кетамину – соединению, применяемому в настоящее время в хирургии для внутривенного наркоза.

Все вещества структуры XXXIV, в том числе теноциклидин, в настоящее время запрещены к применению и находятся под международным контролем. В нелегальном употреблении фенциклидин существует под названиями: *Peace pill*, *Angel dust*, *HOG*, *Killer weed*, *Embalming fluid*, *Rocker fuel*, *Sharms*.



Синтезировано большое число структурных аналогов фенциклидина, многие из которых встречаются в нелегальном обороте и многократно превышают РСР по своей факмакологической активности.

Обычные дозы РСР при подпольном применении составляют 1–7 мг. Действие наступает через 5–15 мин при курении и через 1–2 ч при оральном приеме. При внутривенном введении препарат начинает действовать через 1–2 мин. Его действие длится 11–12 ч. Дозы порядка 5–15 мг вызывают тяжелую интоксикацию в течение 1–4 недель. Дозы 25 мг и выше приводят к тяжелым отравлениям, часто с летальным исходом [28, 33, 34].

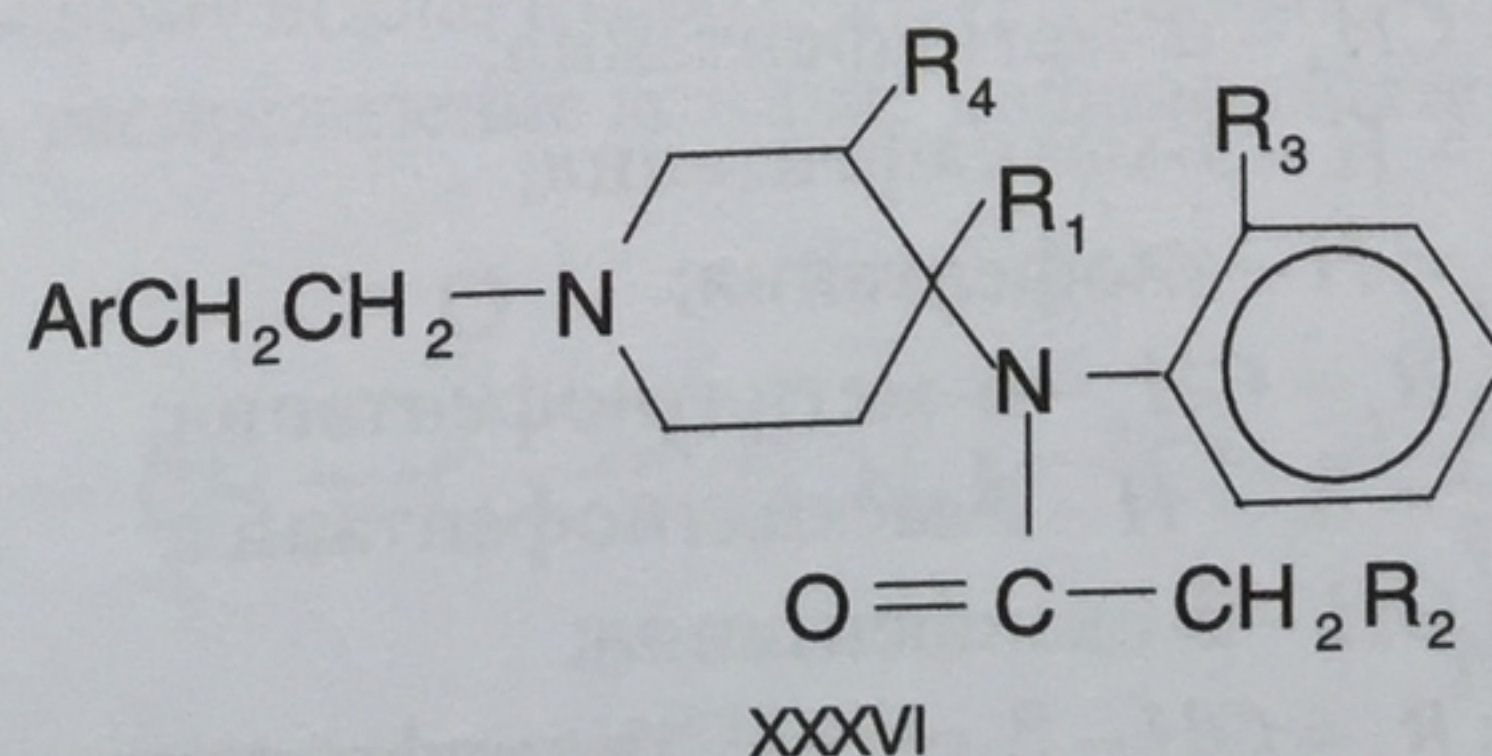
После однократного приема РСР этот препарат может быть обнаружен в биологическом материале в течение нескольких недель.

Основные направления метаболизма в организме человека – гидроксилирование в положения 3 и 4 циклогексанового кольца и в положение 4 пиперидинового цикла, а также окислительное расщепление этого цикла с образованием 5-[N-(1-фенилциклогексил)-амино]-валериановой кислоты (РС-кислоты) и далее 1-фенилциклогексиламина [32, 35, 36]. В ряде случаев содержание этой кислоты в моче существенно превосходит содержание исходного соединения [38]. Продукты гидроксилирования выводятся, в основном, в форме конъюгатов с глюкуроновой кислотой. Поэтому химико-аналитическое определение этих продуктов следует выполнять после предварительного ферментатического или кислотного-щелочного гидролиза исследуемой пробы. Содержание РСР в моче может быть до 24 мкг/мл (чаще от 0,03 до 0,7 мкг/мл), а в случае отравлений может достигать 45 мкг/мл и более [31].

2.11. Фентанил и его аналоги

Фентанил [N-(1-фенилэтил-4-пиперидил)-пропионанилид] представляет собой синтетический анальгетик высокой активности (в 10 раз сильнее морфина), обладающий наркотическими свойствами, аналогичными действию героина. Этот препарат применяется в клинической медицине для предоперативной и послеоперативной медикации. Его анестезирующее действие наступает через 1–2 мин после внутривенного введения и длится 30–60 мин [37, 38]. До настоящего времени синтезировано более 100 аналогов фентанила, различающихся по силе и длительности действия. Порядка 15 из них распространяются в различных странах на нелегальном рынке наркотиков. Чрезвычайно высокая активность (в 100–6000 раз выше, чем у морфина) и относительная легкость синтеза делают эти наркотики серьезной угрозой всему миру.

Химические структуры основных представителей этой группы соединений, используемых в фармакологической практике, отвечают формуле XXXVI.

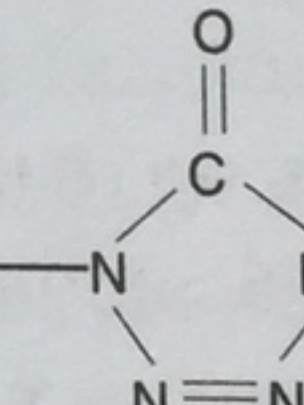


Фентанил и его аналоги, применяемые в фармацевтической практике:

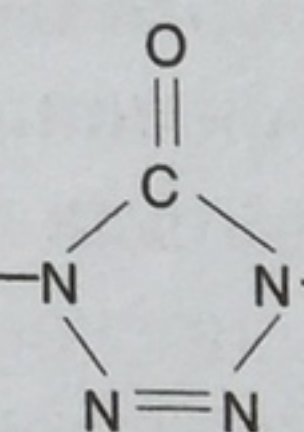
$Ar = C_6H_5$; $R_1 = H$; $R_2 = CH_3$; $R_3 = R_4 = H$ – фентанил;

$Ar = C_6H_5$; $R_1 = COOCH_3$; $R_2 = CH_3$; $R_3 = R_4 = H$ – карфентанил;

$Ar = 2\text{-тиенил}$; $R_1 = CH_2OCH_3$; $R_2 = CH_3$; $R_3 = R_4 = H$ – суфентанил;

$Ar = C_2H_5$ — ; $R_1 = CH_2OCH_3$; $R_2 = CH_3$; $R_3 = R_4 = H$ – альфентанил;

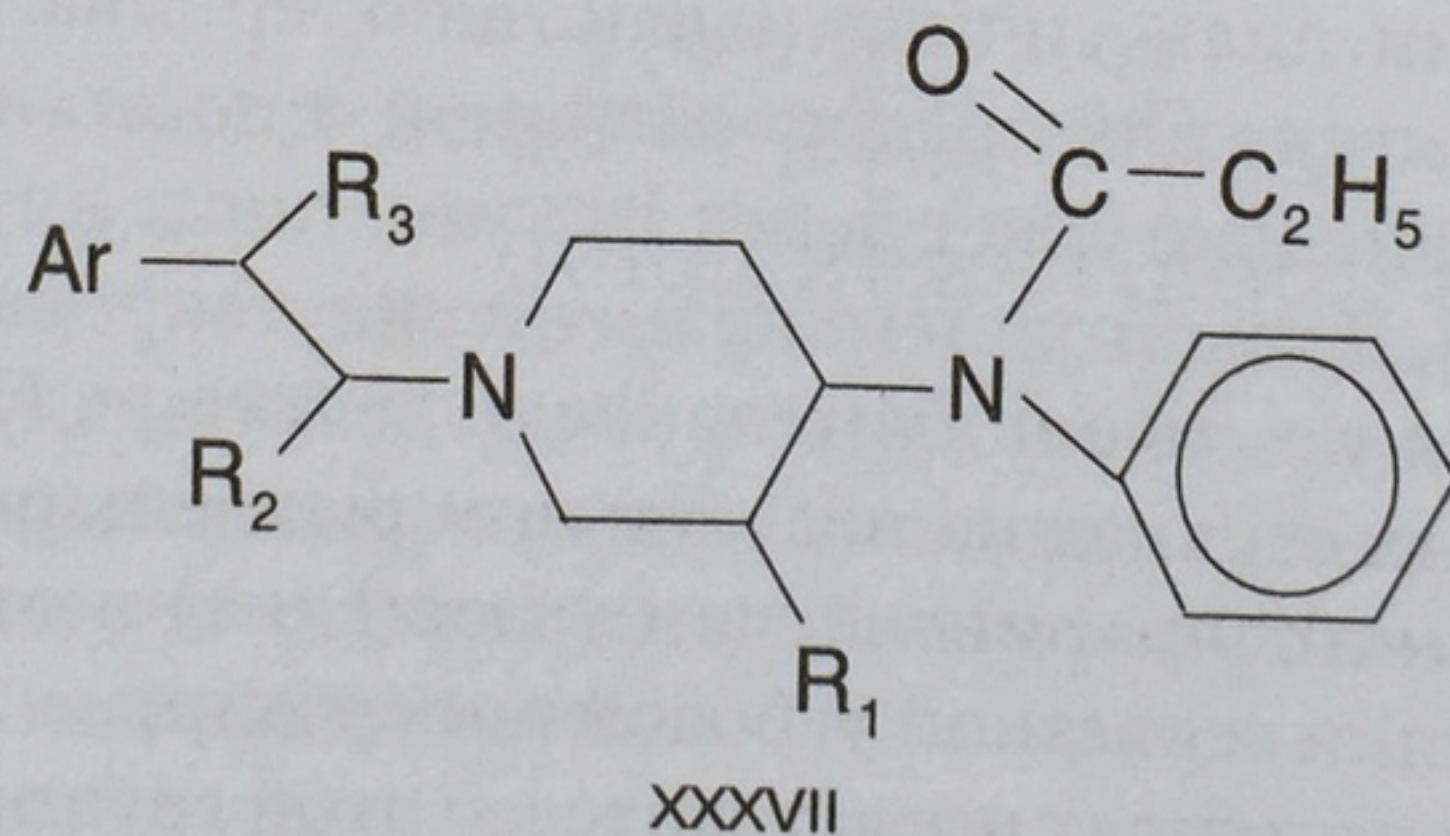
$Ar = C_6H_5$; $R_1 = COOCH_3$; $R_2 = CH_3$; $R_3 = H$; $R_4 = CH_3$ – лофентанил;

$Ar =$ — ; $R_1 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = F$; $R_4 = CH_3$ – брифентанил, А-3331;

$Ar = C_6H_5$; $R_1 = R_3 = R_4 = H$; $R_2 = OCH_3$ – окфентанил, А-3217.

Среди этих соединений **суфентанил** применяется в кардиохирургии благодаря очень высокой эффективности анальгетического действия, **лофентанил** используется в травматологии вследствие большой длительности действия, а **карфентанил** используется в ружейных капсулах для обездвиживания диких животных.

Имеется целый ряд высокоэффективных аналогов фентанила, запрещенных к применению как Конвенцией ООН, так и законодательством Российской Федерации. Некоторые из этих веществ описываются общей формулой XXXVII со следующими обозначениями заместителей:



Запрещенные аналоги фентанила

$Ar = C_6H_5$; $R_1 = R_3 = H$; $R_2 = CH_3$ – α -метилфентанил;

$Ar = C_6H_5$; $R_1 = CH_3$; $R_2 = R_3 = H$ – 3-метилфентанил;

$Ar = 2\text{-тиенил}$; $R_1 = R_2 = R_3 = H$ – тифентанил;

$Ar = 2\text{-тиенил}$; $R_1 = R_3 = H$; $R_2 = CH_3$ – α -метилтиофентанил;

$Ar = 2\text{-тиенил}$; $R_1 = CH_3$; $R_2 = R_3 = H$ – 3-метилтиофентанил;

$Ar = C_6H_5$; $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = OH$ – β -оксифентанил;

$Ar = C_6H_5$; $R_1 = CH_3$; $R_2 = H$; $R_3 = OH$ – β -окси-3-метилфентанил.

Заменой в молекуле α -метилфентанила пропионильной группы при амидном атоме азота на ацетильную получают ацетил- α -метилфентанил, а замена водорода в положении 4 фенильной группы на фтор в молекуле дает *пара*-фторметилфентанил.

При первом появлении этих препаратов на нелегальном рынке наркотиков (1979–1985 гг.) имело место значительное число смертельных случаев из-за передозировки, так как все эти препараты, обладая наркотической активностью, сходной с действием героина, были во много раз более активными. Так, относительная активность по отношению к героину равна 200 для фентанила, 2000 для суфентанила и 6000 для 3-метилфентанила [31, 38–40]. Все эти препараты обычно смешивают с большим количеством лактозы или крахмала, либо распространяют в виде смесей с кокаином или героином.

Распространяемые подпольно препараты содержат не более 1% фентанила или его аналогов и по цвету варьируют от чисто-белого (*Persian White*) до светло-коричневого (*Mexican Brown*). Все это вносит свои затруднения при анализе, тем более что концентрации фентанила и его аналогов в биообъектах обычно не превышают десятых долей или единиц нанограммов на 1 мл.

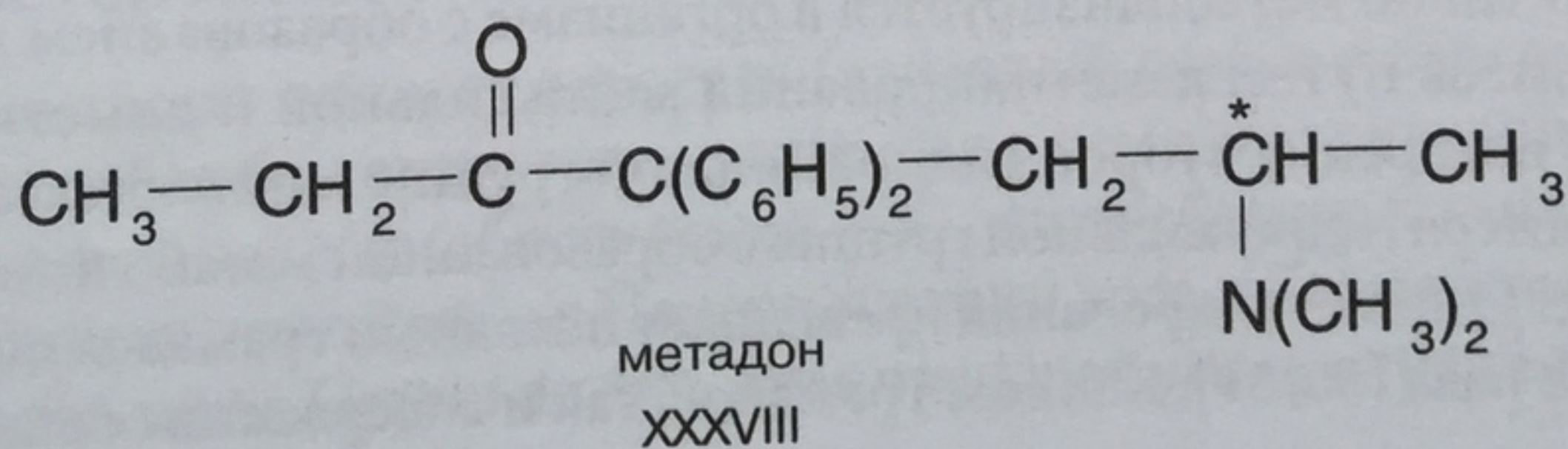
Метаболические изменения фентанила и его аналогов в большинстве случаев заключаются в окислении с внедрением гидроксильных групп в положение 4 фенильной группы, в β -положение этиленового фрагмента, в пиперидиновое кольцо и в β -положение пропионильного радикала. Кроме того, происходит гидролитический отрыв фенильного или пропионильного радикала с возможным окислением остающихся фрагментов молекулы. Всего может образоваться более 10 различных метаболитов, которые в своем большинстве неактивны фармакологически [41]. В форме этих метаболитов выводится из организма с мочой до 98% препаратов в течение 72 ч. При этом в первые 8 ч выводится до 70–80% их общего количества.

Молекулярные массы фентанила и его аналогов составляют 330–350 а.е.м., что делает более предпочтительным для их определения применение методов жидкостной хроматографии.

2.12. Метадон, трамадол, метаквалон

Метадон (6-диметиламино-4,4-дифенилгептанон-3) представляет собой фармацевтический препарат – синтетический опиоид. Хотя его химическая структура (формула XXXVIII) имеет малое сходство с морфином, его действие аналогично. В отличие от морфина, метадон может применяться орально. В медицине метадон использовали вместо морфина как энергичное болеутоляющее средство, а также при лечении больных с героиновой зависимостью.

Энергичное наркотическое действие метадона явилось причиной злоупотреблений, что привело к практически полному исключению его из числа лекарственных препаратов и к отнесению его к веществам, распределение которых должно тщательно контролироваться.



В молекуле метадона имеется один хиральный центр, поэтому в большинстве случаев препараты метадона представляют собой рацемическую смесь двух энантиомеров, причем фармакологическая активность R-метадона (левометадона) в 25–50 раз превышает активность S-метадона [42, 43].

Разовые дозы метадона при вводе в виде инъекций 5 мг, при оральном приеме – таблетки по 5 или 10 мг. Уже через 10 мин после инъекции или через 30 мин после приема внутрь метадон может быть обнаружен в плазме крови. Максимальные концентрации достигают в плазме крови 360 нг/мл, а в моче – до 3900 нг/мл. Метадон энергично метаболизируется в организме человека, образуя многочисленные метаболиты. Основные направления метаболизации следующие:

- а) окисление с образованием N-оксида, внедрением оксигруппы в один из фенильных радикалов или отщеплением этильного радикала у C_3 ;
- б) деметилирование диметиламинной группы и последующая циклизация по кетогруппе с образованием 1,5-диметил-2-этилиден-3,3-дифенилпирролидина (ЭДДП), склонного далее отщеплять вторую метильную группу у атома азота с образованием 5-метил-2-этил-3,3-дифенилпирролидина-1 (ЭМДП). При анализе мочи концентрация ЭДДП часто оказывается близкой или даже существенно более высокой, чем содержание исходного метадона [44].

Разовая доза метадона от 50 до 200 мг может привести к летальному исходу. При этом концентрация метадона в плазме может достигать 2 мкг/мл. Молекулярная масса метадона (основания) равна 309 а.е.м.; молекулярные массы метаболитов лежат в диапазоне 260–325 а.е.м.

Опиоидный анальгетик **трамадол** [(2-диметиламинометил)-1-(3'-метоксифенил)-циклогексанол-1 гидрохлорид] широко применяется в терапии и хирургии для обезболивания при коронарных, онкологических и ортопедических болях [45–46]. Соединение указанной выше химической структуры может существовать в форме двух стереоизомеров с различной конформацией заместителей [47]. Наиболее биологически активным является изомер с аксиальным расположением гидроксильной группы и экваториальным расположением метоксифенильного и диметиламинометильного заместителей. Изомер с аксиальной конформацией диметиламинометильной и гидроксильной групп менее активен. Каждый стереоизомер трамадола существует в форме двух оптически активных энантиомеров, различающихся по своей фармацевтической активности, причем (+)-энантиомер примерно в 10 раз активнее, чем (–)-энантиомер. В то же время в отношении обезболивающего действия наблюдается синергизм действия этих изомеров, в результате чего обезболивающий эффект рацемического препарата выше, чем у каждого энантиомера в отдельности [48].

Обычная терапевтическая доза трамадола составляет 50–150 мг препарата. Действие его наступает через 0,5–1 ч и сохраняется 5–6 ч. При этом содержание трамадола в плазме крови составляет от 10 до 1500 нг/мл [49].

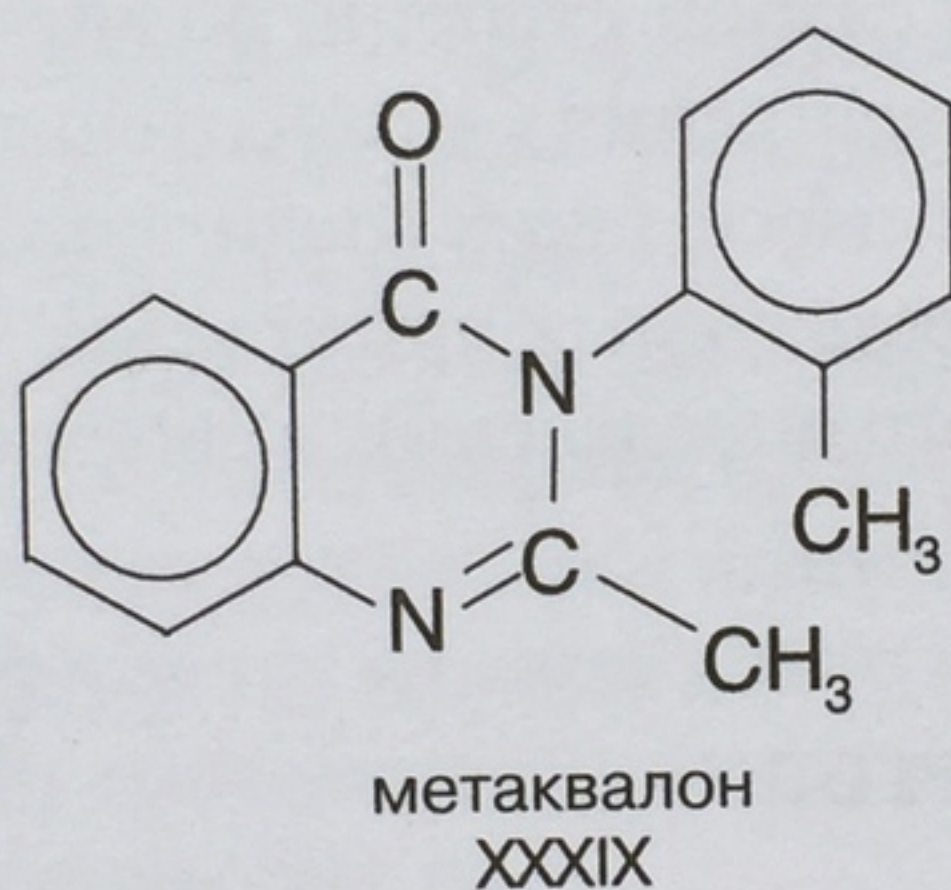
Трамадол активно метаболизируется в организме с образованием довольно большого числа метаболитов путем деметилирования метоксильной и диметиламинометильной групп и путем внедрения второй гидроксильной группы в циклогексановое кольцо. Возможна также потеря гидроксильной группы с образованием метаболита с циклогексановым ядром. Продукт О-деметилирования превышает исходный трамадол по обезболивающему действию в 2–4 раза [50, 51]. Как сам трамадол, так и содержащие гидроксильные группы

его метаболиты способны образовывать конъюгаты с глюкуроновой кислотой, причем их содержание в моче обычно сравнимо с содержанием исходных соединений [49].

Основное количество принятого орально трамадола выводится с мочой в течение 36–72 часов. В неизмененном виде экскретируется почками около 30%.

Прием больших количеств трамадола наркоманами может приводить к тяжелым отравлениям и к смертельным исходам. При этом отмечены концентрации трамадола в крови вплоть до 13–23 мг/л, а его основных метаболитов – порядка 4 мг/л [52, 53]. Молекулярные массы трамадола и его основных метаболитов лежат в диапазоне от 227 до 260.

Важным психотропным средством, специально отмеченным среди запрещенных к применению Конвенцией ООН [22], является метаквалон [2-метил-3-(О-толил)-4-хи-назолинон] – вещество, использовавшееся в медицине под многочисленными синонимами (ортонол, аквалон, дорисед, ноктилен, сомнотропон и т.д.) [54]. Молекулярная структура метаквалона соответствует формуле XXXIX:



Обычно метаквалон применяли орально. При этом препарат быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта. Снотворное действие проявляется через 15–30 мин после приема, сон продолжается 6–8 ч. Этот препарат применяли при нарушении сна различной природы, например при бессоннице, связанной с острыми и хроническими болями. Обычно препарат назначали в количестве 0,2 г (1 таблетка). Однако выявлена возможность привыкания и лекарственной зависимости от метаквалона, что и послужило поводом к его запрету на международном уровне.

Чистый метаквалон представляет собой белый кристаллический порошок, хорошо растворимый в липофильных органических растворителях. В воде и спирте метаквалон растворяется плохо.

Молекулярная масса этого препарата 250; в организме он метаболизируется, в основном, с разрывом связей C-N и выводится с мочой в течение 36–48 ч.

2.13. Второстепенные психодепрессанты и психостимуляторы

К этой группе веществ относят алкоголь (этиловый спирт, в редких случаях изопропиловый спирт), табак благодаря содержащемуся в нем алкалоиду никотину, кофеин, содержащийся в кофе и чае, кат (абиссинский чай), употребление которого распространено в странах Африканского Рога и в Йемене, и плоды кола, обладающие определенным тонизирующим действием. Прием внутрь этих препаратов или курение табака вызыва-

ют подъем настроения и вместе с тем наносит ощутимый вред организму. В практике химико-аналитических и судебно-химических исследований приходится встречаться с определением следов алкоголя в выдыхаемом воздухе и, к сожалению, в достаточно многочисленных случаях в крови и органах трупов людей, погибших от отравлений или от иных причин, связанных с употреблением алкоголя.

2.14. Вещества, связанные с токсикоманией

В последние десятилетия распространились случаи использования летучих растворителей для создания приятных ощущений, приподнятого эйфорического настроения путем вдыхания их паров. Такое химическое воздействие на психику принято называть **токсикоманией**. Наиболее часто для этой цели используют такие часто встречающиеся в быту растворители, как бензин, ацетон, эфир, хлороформ, трихлорэтилен (жидкость для химической чистки одежды), эфиры уксусной кислоты (клей «Момент»), растворители лаков и красок и др. Регулярное повторение этой процедуры приводит к формированию психической зависимости от этих веществ, хотя физическая зависимость может отсутствовать или может проявляться в слабой степени. Значительное число таких веществ представляет собой химические соединения с относительно небольшой молекулярной массой, либо многокомпонентные смеси таких соединений (бензин, растворители).

Для большинства веществ, используемых при токсикомании, имеются разнообразные методы химико-аналитического определения, в своем большинстве базирующиеся на основе газовой хроматографии.

2.15. Допинговые средства

К числу запрещенных допинговых средств в настоящее время относят уже рассмотренные выше стимуляторы центральной нервной системы типа, например амфетаминов, иные наркотические вещества, включая алкоголь, а также вещества анаболического характера (анаболические стероиды), мочегонные средства, маскирующие агенты и другие вещества [55]. Амфетамины и другие стимуляторы нервной системы могут способствовать улучшению результатов в скоростных видах спорта, таких например, как бег или плавание. Препараты, относящиеся к группе β -блокаторов, могут создать определенные преимущества для участников соревнований в тех видах спорта, где важна устойчивость и «твердость руки», как, например, при стрельбе из лука или из огнестрельного оружия. Наконец, считается, что употребление анаболических стероидов может способствовать наращиванию мышечной массы и таким образом создавать преимущества для тяжелоатлетов.

Все без исключения допинговые средства, помимо этической нечистоплотности их использования, определенно могут причинять вред организму спортсменов, что и должно служить главной причиной запрещения их использования.

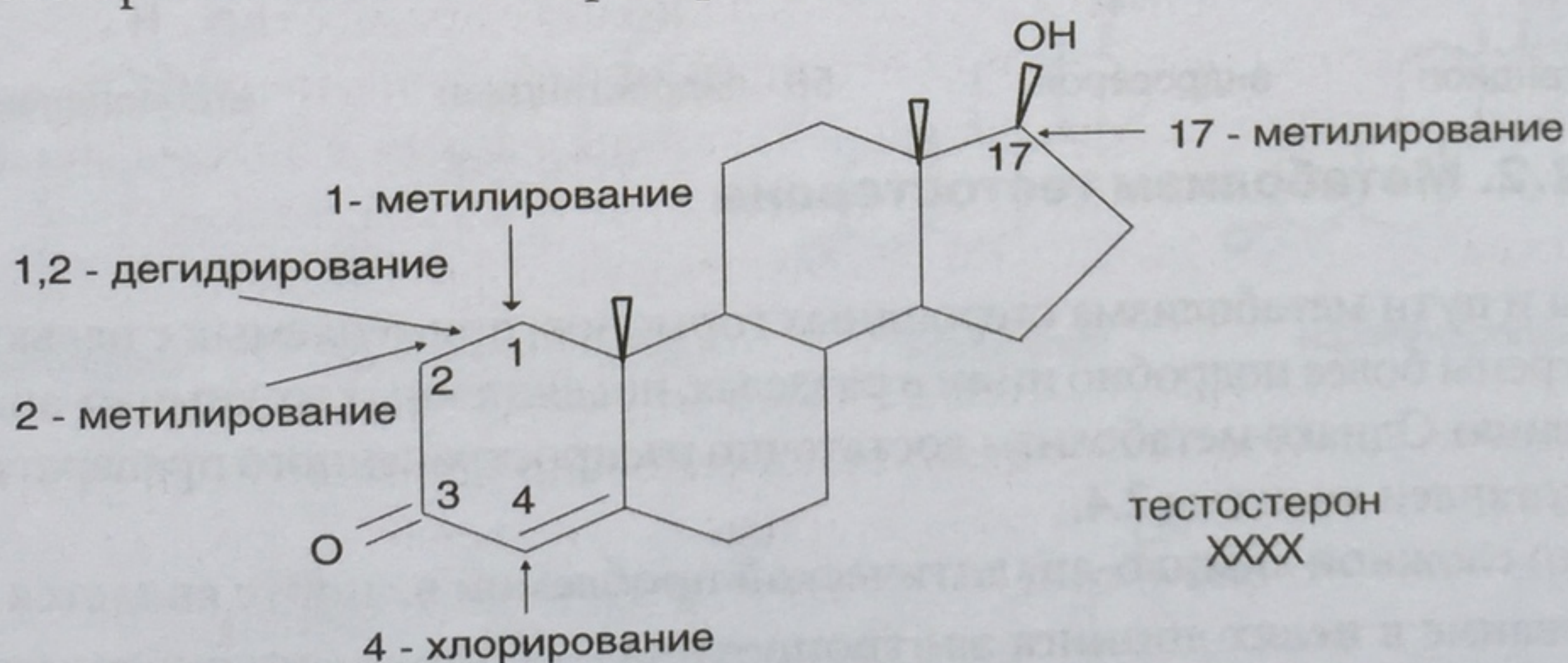
Впервые допинг-контроль был введен Международным Олимпийским Комитетом в 1968 году. Позже к этому запрету присоединились многие спортивные федерации разных стран. Перечень запрещенных средств непрерывно расширяется, как и масштабы обследования спортсменов на крупных международных соревнованиях. Так, в 1992 году на летних Олимпийских играх в Барселоне (Испания) было проведено более 1850 анализов отобранных у спортсменов биологических проб (преимущественно мочи)

на содержание запрещенных допинговых средств [57]. В 1996 году во время Олимпийских игр в Атланте (США) общие затраты на организацию и проведение допинг-контроля превысили 2,5 млн долларов США. В 1995 году 24 лаборатории, аккредитованные Международным Олимпийским Комитетом, провели более 9000 анализов проб, отобранных у спортсменов. При этом 41% проб были взяты во время соревнований. Общее число положительных заключений о применении допингов составило 1,6 %. Из них 65% составляли случаи применения анаболических стероидов, 21% – применение стимуляторов и 4% – применение диуретиков. Лишь в очень малом числе случаев было выявлено использование гормонов пептидного характера [58].

Как правило, допинговые средства присутствуют в исследуемых биологических объектах в концентрациях, не превышающих десятков нанограмм на 1 мл, что определяет необходимость использования для их выявления наиболее совершенных аналитических методов и приборов.

Даже в этих случаях часто не удастся выявить химико-аналитическими методами такие допинговые соединения, которые продуцируются естественным путем в человеческом организме. Например, очень трудно выявить использование в целях допинга гормона роста (*hGH*) или продуктов его превращений в организме. В то же время считается, что введение гормона роста в период тренировок может ускорять распад жиров и интенсифицировать синтез белка в организме.

Несколько легче выявляется применение для целей допинга стероидных гормонов. Так, использование для этой цели **тестостерона** (формула XXXX) может быть выявлено при сопоставлении уровней содержания в моче этого гормона и его метаболита **эпитестостерона**. Этот эпимер не образуется из введенного извне тестостерона, так что сильное превышение нормального соотношения этих соединений 1:1 служит признаком незаконного применения этого препарата.



Аналогично по соотношению концентраций исходного соединения и его метаболитов может быть выявлено применение для целей допинга дегидротестостерона. Основные пути метаболизма тестостерона показаны на схеме 2.2.

В качестве допинговых средств применяют многочисленные аналоги стероидных гормонов, синтезированные в химических лабораториях. Некоторые примеры таких соединений приведены на схеме 2.3.

В ряде случаев введение чужеродных стероидных гормонов может быть выявлено по соотношению стабильных изотопов ^{13}C и ^{12}C , которое для введенного в организм чужеродного вещества может отличаться от величины, характерной для данного организма.

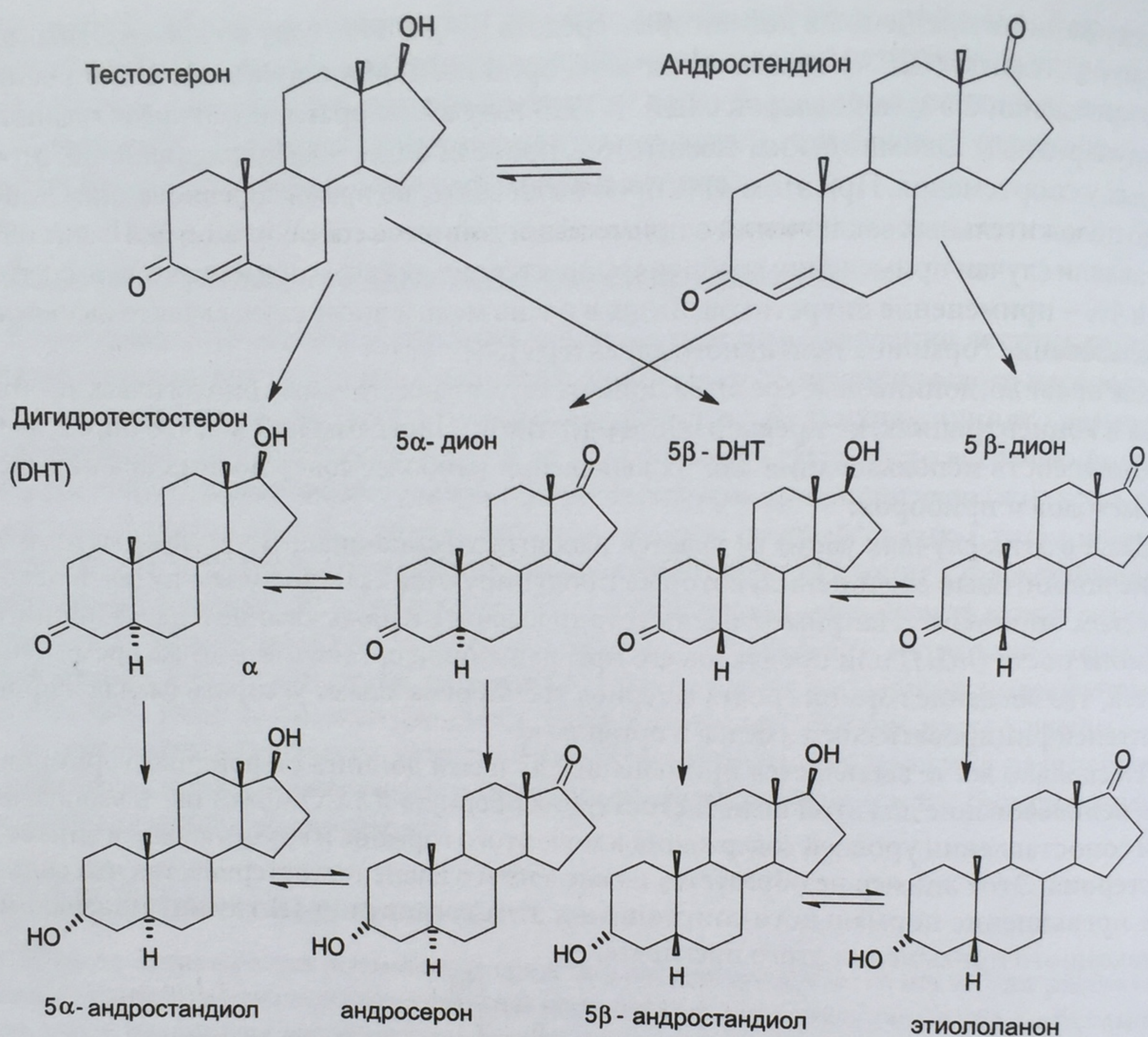


Схема 2.2. Метаболизм тестостерона

Структуры и пути метаболизма стероидных гормонов, применяемых с целью допинга, будут рассмотрены более подробно ниже в разделах, посвященных их химико-аналитическому определению. Однако метаболизм достаточно распространенного препарата – метандиенона представлен на схеме 2.4.

Достаточно сложной химико-аналитической проблемой в спорте является незаконное использование в целях допинга эритропоэтина – белка, стимулирующего продуцирование красных кровяных телец и тем самым увеличивающего способность крови переносить кислород. Считается, что введение эритропоэтина может способствовать улучшению результатов в таких видах спорта, как бег или велосипед.

Эритропоэтин является коммерчески доступным лекарственным препаратом. С его незаконным применением связывают несколько случаев смерти спортсменов во время соревнований. Для выявления незаконного использования этого препарата предложен ряд тестов, связанных с определением концентрации ряда ферментов крови (трансферина и др.) [62]. Еще более затруднительным является химико-аналитическое выявление таких манипуляций, как использование препаратов крови, красных кровяных телец и гемоглобина, что, к сожалению, пока еще практикуется в спортивной среде.

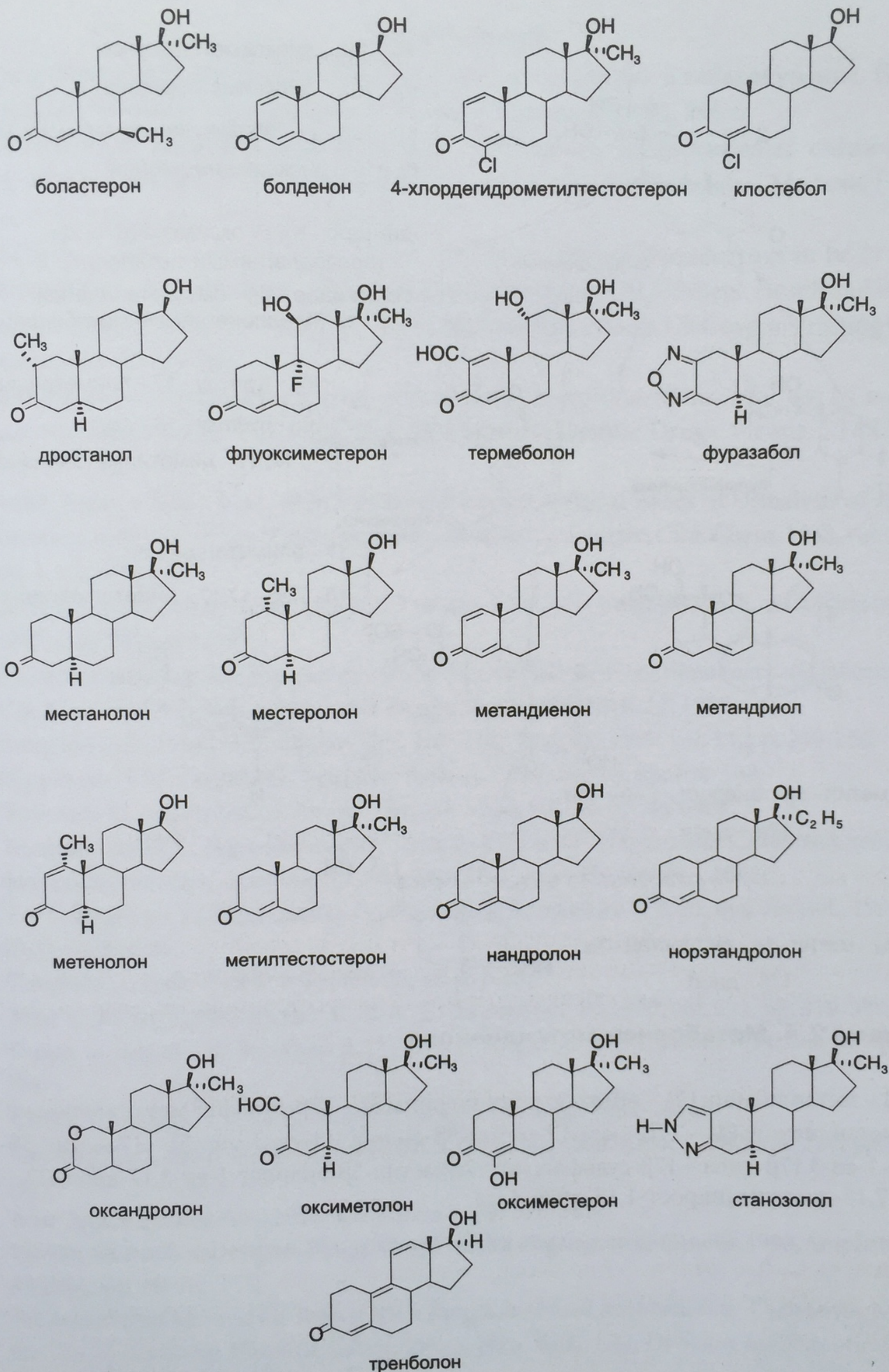


Схема 2.3. Структурные формулы синтетических стероидов

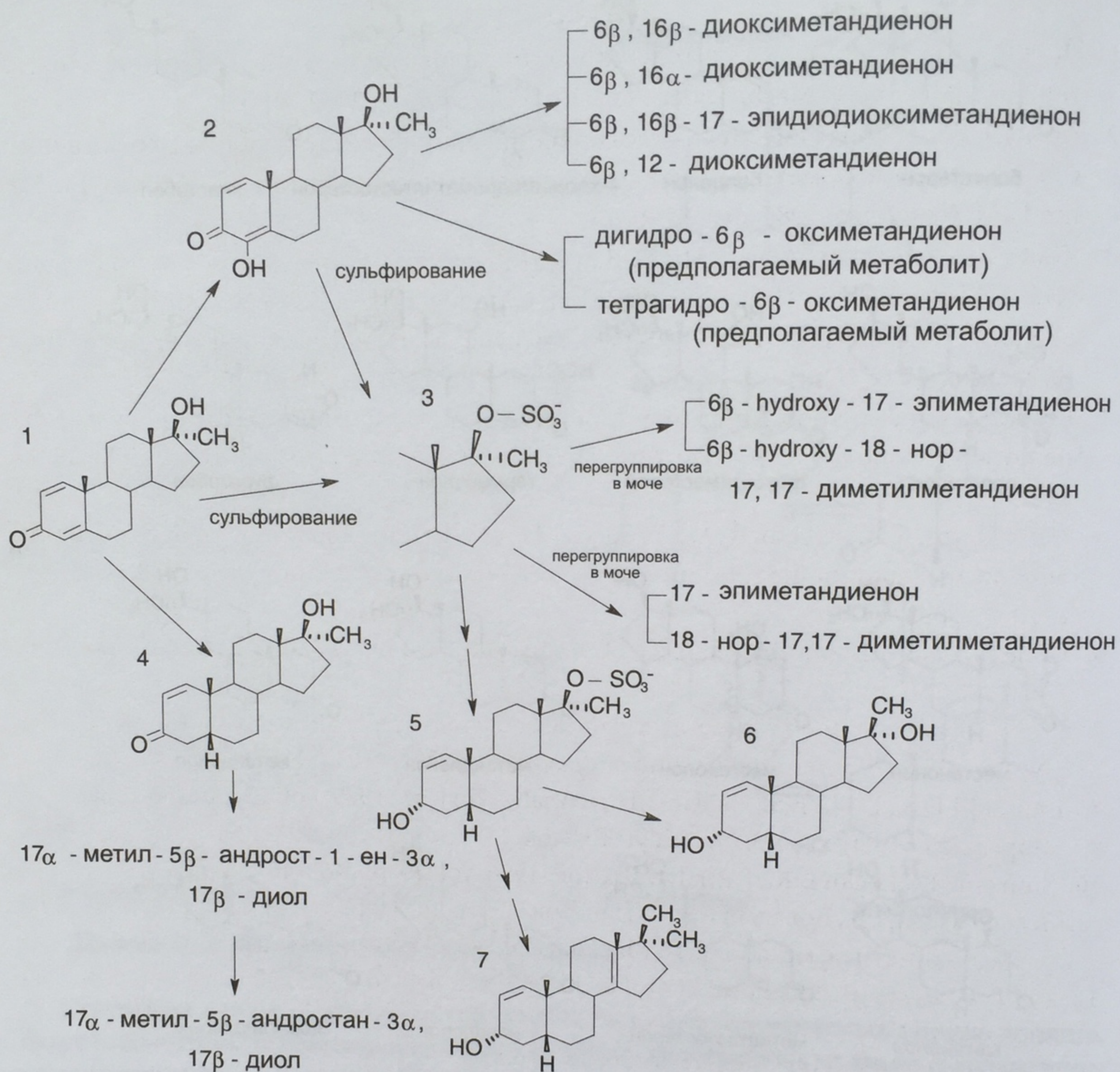


Схема 2.4. Метаболизм метандиенона

(1) – метандиенон; (2) – 6β-оксиметандиенон; (3) – 17β-сульфат метандиенона и 6β-оксиметандиенон; (4) – 17β-окси-17-метил-5β-андрост-1-ен-3-он; (5) – 17-метил-5β-андрост-1-ен-3,17β-диол – 17β-сульфат; (6) – 7β-метил-5β-андрост-1-ен-3,17-диол; (7) – 18-нор-17,17-диметиландрост-1,13-диен-3-ол.

Литература

1. Профилактика наркомании, токсикомании, алкоголизма и табакокурения. Нормативные правовые акты, Москва: Изд. дом «Нарконет», 2002, 286 с.
2. Кислун Ю.В. Химико-токсикологический анализ лекарственных соединений. Сб. «Современные методы химико-токсикологического анализа», Москва: И ММИ им. И.М. Сеченова, 1986, стр. 89-106.
3. Zoiltz R.L, Fentiman A.N., Zoltz R.B., GC/MS assays for abused drugs in body fluids. National Inst. on Drug Abuse (NIDA) Research Monograph 32, US Dept. Health and Human Services, Publication No (ADM) 80-1014, Rockville, Maryland, US Govern. Printing Office, Washington, DC, 1080.
4. Recommended method for testing opium/crude morphine. Manual for use by national narcotic laboratories. UN, New York, Division of Narcotic Drugs. Vienna. ST/NAR/11, 1987.
5. Amer. Assos. Chin. Chem. (AACC). Special Report. Critical Issues in Urinalysis of Abused Substances, Report of the Substance-Abuse Testing Committee, Clin. Chem. 1988, vol. 1 (34), no. 3, p.p. 605-632.
6. Cone E.J., Gorodetzky C.W., Yah. S.Y., Darwin W.D., and Buchwald W.F., J. Chromatogr. B., 1982, vol. 230, pp. 57-67.
7. Recommended method for testing heroin. Manual for use by national narcotic laboratories. UN, New York. Division of Narcotic Drugs. Vienna, ST/NAR/11, 1987.
8. Isenschid D.S., Levin B.S., Caplan Y.H., J. Analyt. Toxicol., 1989, vol. 13, pp. 250-256.
9. Hippenstiel M.J., Genson B., J. Analyt. Toxicol., 1994, vol. 18, pp. 104-109.
10. Smirnow D., Logan B.K., J. Analyt. Toxicol., 1996, vol. 20, pp. 463-467.
11. Веселовская Н.В., Коваленко А.Е., Папазов И.П. и др., Наркотики. Свойства, действие, фармакокинетика, метаболизм. Москва: Изд. дом «Нарконет», 2002.
12. Fay J., Fogerson R., Shjenolorfer D., Niedbale R.S., Spiehler V., J. Analyt. Toxicol., 1996, vol. 20, pp. 398-403.
13. Kavabata E., Bull. TIAFT, 1996, vol. 26, no. 4, p.33.
14. Miki A., Keller T., Regenscheit P., et al., J. Chromatogr. B., 1997, vol. 692, pp. 319-328.
15. Dugan S., Bogema S., Schwartz R.W., Lappas N.T., J. Analyt. Toxicol., 1994, vol. 18, pp. 391-396.
16. Crifasi J., Long C., J. Forens. Sci., 1996, vol.41, no. 6, pp. 1082-1084.
17. Dowling G.P., McDonongh E.T. II, Bost R.O., J. Am. Med. Assoc., 1987, vol. 267, pp. 1615-1617.
18. Bost R.O., J. Forens. Sci., 1988, vol. 33, no. 3, pp. 576-587.
19. Inform. Manual on Designer Drugs. World Health Organization. Geneva, 1990, Amphetamine Analogs, pp. 40-78.
20. Recommended Method for Testing Illicit Ring Substituted Amphetamine Derivatives. Manual for Use by National Narcotic Laboratories. New York: UN. Division on Narcotic Drugs, Vienna. ST/ NAR/12, 1987.
21. Maures H.H., Ther. Drugs Monitor. 1966, vol. 18, no. 4, pp. 465-470.

22. Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В., Анализ наркотических средств, Москва: Мысль, 1993, с. 17-21.
23. Бабаханян Р.В., Бушуев Е.С. и др., Псилоцибиносодержащие грибы, С.-П, 1998.
24. Barry T.L., Petzinger G., Zito S.W., J. Forensic Sci., 1996, vol. 41, no. 6, pp. 1068-1073.
25. Nelson C.C., Foltz R.L., J. Chromatogr. B., 1991, vol. 580, pp. 97-102.
26. Rapani L., Shavone S., Garofano L., J. Forensic Sci., 1994, vol. 39, no. 2, pp. 512-517.
27. Nelson C.C., Foltz R.L., Analyt. Chem., 1992, vol. 64, pp. 1578-1585.
28. Recommended Method for Testing Lysergide (LSD). Manual for use by National Narcotic Laboratories. UN, New York. Divisions of Narcotic Drugs, Vienna. ST/NAR/17, 1989.
29. Cho A.K., Hiramatsu M., Schmitz D.A., Landaw E.M., Chang A.S., Ramamurthy S., Jenden D.J., Drug Metab. Dispos., 1993, vol. 21, pp. 125-132.
30. Cone E.J., Darwin W.D., Yousefnejad D., Buchwarld W.F., J. Chromatogr. B., 1979, vol. 177, pp. 149-153.
31. Information Manual on Designer Drugs. Program on Substance Abuse, World Health Organization/PSA/90,5. 1991, p.p. 79-101.
32. Elsohly M.A., Little T.L., Mitchekk J.M., Paul B.D., Mell L.D., Irving J., J. Analyt. Toxicol., 1988, vol. 12, pp. 180-182.
33. Goldbergger B.A., Cone E.J., J. Chromatogr. B., 1994, vol. 674, no. 1, pp. 73-86.
34. McClurcan M.B., Valentine J.L., Owens S.M., J. Pharm. Exp. Ther., 1993, vol. 266, pp. 1439-1445.
35. Cone E.J., Buchwarld W., Yousefnejad D., J. Chromatogr. B., 1981, vol. 223, pp. 331-339.
36. NIDA Research Monograph, Series 64. Phencyclidine; An Update. D H. Clouet, Ed., 1984.
37. Hippenstiel M.J., Genson B., J. Analyt. Toxicol., 1994, vol. 31, pp. 2-28.
38. Poklis A., Clin. Toxicol. 1995, vol. 12, pp. 183-191.
39. Hammargren W.R., Henderson G.L., J. Analyt. Toxicol., 1988, vol. 12, pp. 183-191.
40. Henderson G.L., J. Forensic Sci., 1988, vol. 33, pp. 569-573.
41. Alamercery S., Dutruch L., Dautraix S., Pedrix J.P., Brazier J.L., J. Chromatogr. B., 1997, vol. 693, pp. 59-70.
42. Kintz P., Eser H.P., Tracqui A., Moeller M., Cirimeker V., Mangin P., J. Forensic Sci., 1997, vol. 42, pp. 291-295.
43. Norris R.L.G., Ravenscroft P.J., Pond S.M., J. Chromatogr. B., 1994, vol. 661, pp. 346-350.
44. Phan-Huy C., Chikhi-Chorfin N., Galons H., et al., J. Chromatogr. B., 1997, vol. 70, pp. 155-163.
45. Besson J.M., Vickers M.D., Tramadol Analgesia: Synergy in Research and Therapy, Drugs, 1994, vol. 47, suppl. 1, pp. 1-2.
46. Sunshine A., Tramadol Analgesia: Synergy in Research and Therapy, Drugs, 1994, vol. 47, suppl. 1, pp. 8-18.
47. Ceccato A., Chiap P., Hubert P., Crommen J., J. Chromatogr. B., 1997, vol. 698, pp. 161-170.
48. Raffa R.B., Friderichs E., Reinmann W., Shank R.P., Codd E.E., J. Farm. Experim. Ther., 1993, vol. 267, pp. 331-340.

49. Lintz W., Uragg H., J. Chromatogr. B., 1985, vol. 341, pp. 65-79.
50. Overback P., Blaschke G., Arch. Pharmacol., 1993, vol. 326, no. 9, p. 682.
51. Paar W.D., Frankus P., Dengler H.J., Clin. Invest. 1992, vol. 70, pp. 708-710.
52. Goeringer K.E., Logan B.K., Christian G.D., J. Analyt. Toxicol., 1997, vol. 21, pp. 529-537.
53. Luthof K.J., Zweipfenning P., G., M., J. Analyt. Toxicol., 1998, vol. 22, p. 260.
54. Машковский М.Д., Лекарственные средства, ч.1, Вильнюс: ЗАО «Гамты», 1994, с. 29.
55. Drug Abuse Handbook, New York: CRC, 1998.
56. International Olympic Committee. Medical Code and Explanatory Document. Lausanne: IOC, 1995.
57. Zurer P.S., Chem. Ing. News, 1996, vol. 74, pp. 28-29.
58. IOC Medical Commission Internal Statistic Report, Lausanne: IOC, 1996.
59. Schanzer W., Donike M., Anal. Chem. Acta, 1993, vol. 275, p. 23.
60. Rongone E.L., Segaloff A., Steroids, 1963, vol. 1, p. 170.
61. Durbeck H.W., Bucker I., Biomed. Environ. Mass Spectrom., 1980, vol. 7, p. 437.
62. Gareou R., Audran M., Bayhes R.D. et al, Nature, 1996, vol. 380, p. 113.

ГЛАВА 3

ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ОБЪЕКТОВ ХИМИКО-АНАЛИТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ СОЕДИНЕНИЙ, ПОДЛЕЖАЩИХ КОНТРОЛЮ

Химико-аналитическое исследование на присутствие наркотических веществ может проводиться путем анализа следующих объектов:

- 1) Фармацевтические формы – твердые вещества в виде таблеток, капсул, порошков, часто смеси целевых веществ с сахаром (сахарозой, глюкозой, лактозой и др.), крахмалом или поваренной солью [1].
- 2) Вещества, представляющие собой продукты биологического происхождения и сложного состава (пищевые продукты, такие как хлеб, твердые жиры и масла, образцы растительного происхождения (стебли, листья, плоды растений) [2].

При проведении анализов на содержание и/или применение допинговых средств в подавляющем большинстве случаев объектами химико-аналитического исследования являются пробы мочи или крови испытуемых спортсменов. При отборе таких проб должны соблюдаться предосторожности, описанные в гл. 1, для предотвращения возможных случаев подмены или фальсификации проб, либо изменения их состава.

Получение правильного результата анализа в очень большой степени зависит от достаточно рациональной и надежной методики обработки пробы биоматериала и, в первую очередь, от полноты извлечения содержащихся в ней контролируемых веществ и перевода их при необходимости в ту или иную форму, наиболее подходящую для применяемого метода анализа.

Методы выделения целевых веществ из объекта химико-аналитического исследования в своем большинстве включают стадии измельчения для твердых веществ и таких биообъектов, как органы и фрагменты органов и тканей живых людей и трупов. Измельченный, дезинтегрированный материал экстрагируют растворителями. Состав экстрагентов в большой степени зависит от природы предполагаемых целевых соединений. Во многих случаях стадии экстракции предшествуют стадии удаления белковых составляющих пробы и гидролитическое расщепление конъюгатов, например, глюкуро-нидов, при анализе проб мочи [4].

Для успеха анализа огромное значение имеет правильное хранение пробы в промежутке времени между ее отбором и обработкой. Наиболее предпочтительным при этом является хранение пробы в условиях глубокого замораживания при температурах от -20 до -56°C , т.е. при замораживании сухим льдом или даже жидким азотом.

Химико-аналитическое исследование биологических объектов в значительной степени осложняется наличием в пробе различных эндогенных и экзогенных веществ, за-

частую не имеющих отношения к соединениям, являющимся целью химико-аналитического определения, а в других случаях, тождественных с ними.

Так, например, распределение токсических продуктов в организме человека определяют такие факторы, как возраст, пол и вес обследуемого субъекта; наличие в организме таких экзогенных веществ, как кофеин, никотин, алкоголь, лекарственные вещества; характер пищи, употреблявшейся в течение ближайших часов перед отбором пробы.

Уровень микроконцентраций целого ряда веществ в организме может зависеть от различных болезней, контактов обследуемого субъекта с соединениями бытовой или индустриальной химии и даже от генетических особенностей пациента.

При анализе твердых препаратов, содержащих предположительно те или иные контролируемые вещества, пробу измельчают и далее экстрагируют подходящим экстрагентом. В тех случаях, когда предполагается наличие азотсодержащих веществ аминного характера (алкалоидов, например, опиатов, кокаина, эфедрона, нейростимуляторов, галлюциногенов и т.п.), первичную экстракцию целесообразно провести экстрагентом кислого характера (1н раствором хлороводородной или азотной кислоты). Далее водную вытяжку обрабатывают щелочью до pH 11–12 и щелочной раствор экстрагируют липофильным растворителем (эфир, хлороформ). Полученный экстракт упаривают до объема 1–2 мл и остаток анализируют тем или иным методом (хроматографическим, спектральным, иммунохимическим и т.д.). В том случае, когда имеются основания предполагать наличие в пробе психотропных веществ липофильного характера (каннабиноидов), стадию кислотной экстракции можно опустить и экстрагировать пробу сразу липофильным растворителем (эфир, ацетон, хлороформ, хлористый метилен). Далее полученный экстракт упаривают до объема 1–2 мл и остаток анализируют подходящим методом [5].

При анализе проб крови следует иметь в виду, что содержание контролируемых веществ в крови достаточно изменчиво вследствие протекания интенсивных биохимических процессов. Различается содержание токсических веществ в крови живых людей и трупов, а также в артериальной и венозной крови.

Для предотвращения свертывания крови к пробе могут добавляться антикоагулянты. При этом гепарин разрушает комплексы жирных кислот с белками, что может приводить к увеличению содержания этих веществ в экстрактах. Другими эндогенными соединениями, которые обнаруживаются в экстрактах проб крови, могут быть стероидные гормоны (например, тестостерон) и холестерин. Наличие этих соединений затрудняет обнаружение, например, анаболических стероидных гормонов при допинг-контроле. Другие жидкие пробы со значительным содержанием биологических веществ (содержимое желудка, содержимое кишечника, слюна, кофе, молоко, сиропы, супы и т.п.) вначале при необходимости разбавляют водой, затем подвергают дезинтеграции, подкисляют хлороводородной кислотой и экстрагируют диэтиловым эфиром 2–3 раза при примерном соотношении объемов экстрагента и пробы 1:10. После фильтрации водный слой подщелачивают аммиаком или едким натром до pH 11–12 и экстрагируют хлороформом. После осушки безводным сульфатом натрия и отгонки растворителя до объема 1–2 мл экстракт анализируют подходящим методом на присутствие веществ основного характера. Первичный эфирный экстракт подвергают реэкстракции свежеприготовленным раствором бикарбоната натрия, чтобы отделить вещества кислотного характера от слабокислых и нейтральных веществ. Эфирный слой подсушивают безводным сульфатом натрия, фильтруют и упаривают, после чего анализируют подходящим методом на присутствие слабокислых и нейтральных веществ (каннабиноиды и др.) [6].

Водный слой после реэкстракции подкисляют хлороводородной кислотой и еще раз экстрагируют эфиром. Водный остаток отбрасывают, а вторичный эфирный экстракт осушают, фильтруют и упаривают до объема 1–2 мл, после чего анализируют на присутствие веществ кислотного характера.

Наиболее сложен анализ проб с большим содержанием биологических веществ. К этой группе объектов относятся растительные материалы разного характера (маковая соломка, гашиш, головки мака, сухие растения мака или конопли и т.п.), образцы волос и ногтей живых людей, ткани и органы трупов (мышцы, печень, почки, мозг), фекалии и меконий новорожденных и т.п. Все эти пробы после гомогенизации подкисляют хлороводородной кислотой, смесь насыщают сульфатом аммония и после фильтрования экстрагируют этиловым эфиром, извлекая нейтральные и слабокислые вещества. Водный слой подщелачивают концентрированным раствором аммиака или натриевой щелочи и экстрагируют хлороформом или хлористым метиленом. Водный слой отбрасывают, а экстракт после осушки безводным сульфатом натрия и фильтрования упаривают до объема 1–2 мл. Этот концентрат анализируют подходящим методом на наличие веществ основного характера (опиаты, кокаин и т.п.).

Первичный эфирный экстракт реэкстрагируют раствором натриевой щелочи или насыщенным раствором бикарбоната натрия. Эфирный слой после осушки, фильтрования и упаривания анализируют на присутствие веществ нейтрального характера, а водный слой объединяют с водным раствором после первой реэкстракции. Объединенный раствор подкисляют хлороводородной кислотой и еще раз экстрагируют эфиром. В эфирном экстракте после осушки, фильтрования и упаривания определяют вещества кислотного характера.

Ниже приводятся характеристики некоторых часто встречающихся в анализе контролируемых веществ объектов биологического характера.

Моча как объект химико-аналитического исследования встречается наиболее часто. Моча содержит незначительное количество белковых компонентов, что существенно облегчает выделение и анализ контролируемых веществ. С другой стороны, многие токсичные вещества и допинговые средства (в частности стероидные гормоны) присутствуют в моче в форме конъюгатов с глюкуроновой кислотой по гидроксильным или аминным группам. Поэтому во многих случаях первичной операцией при химико-аналитическом исследовании мочи является кислотный, щелочной или ферментативный гидролиз, ведущий к расщеплению конъюгатов. Состав мочи легко подвергается изменениям вследствие активности бактериальной флоры. Для предотвращения этого явления в пробы добавляют бактериостатические вещества (фторид натрия, борную кислоту и др.). Однако при этом очень важно сохранять пробы при низкой температуре, предпочтительно в замороженном состоянии. В моче обычно присутствует целый ряд эндогенных соединений (амины, мочевины, мочевиная кислота, карбоновые кислоты, стероиды, небольшое количество сахаров и желчных пигментов, придающих моче желтую окраску).

Многие токсические вещества удается выявить при анализе слюны. Этот объект является менее сложным, чем кровь или моча, причем известно, что существует тесная корреляция между содержанием многих токсичных веществ в крови и их концентрацией в слюне. Все рекомендации относительно консервации и хранения проб, изложенные выше, применимы и к пробам слюны, обычно обладающим высокой ферментативной активностью.

Желчь в химико-аналитической практике встречается реже. Эта биожидкость представляет собой продукт секреторной активности печени. В ее состав обычно входит большое число эндогенных веществ, характерных для крови и плазмы. Кроме того, в состав желчи входят желчные кислоты, по химической структуре родственные стероидным гормонам, и пигменты.

Достаточно сложным объектом химико-аналитического исследования являются пробы *ткани печени*. Вследствие многообразия функций, выполняемых в организме печенью, в экстрактах тканей этого органа, как правило, присутствует большое число эндогенных и экзогенных веществ, включая продукты белкового, углеводного и жирового обмена, стероиды и их метаболиты, фосфолипиды, холестерин, желчные кислоты и билины – желчные пигменты. Эти вещества образуются в результате разрушения гемоглобина с образованием открытых тетрапирролов. Желчные пигменты билирубин и биливердин выводятся с желчью в форме глюкуронидов. Такие соединения интенсивно поглощают свет в видимой области, что может затруднить спектральное исследование экстрактов. Обработка таких проб включает дезинтеграцию и гомогенизацию проб при разбавлении водой, подкисление хлороводородной кислотой и двух-трехкратную экстракцию диэтиловым эфиром. Далее водный слой подщелачивают аммиаком или гидроксидом натрия и экстрагируют хлороформом для извлечения веществ основного характера. Органический экстракт сушат безводным сульфатом натрия, фильтруют, отгоняют хлороформ в мягких условиях (при низкой температуре, в вакууме водоструйного насоса) и остаток объемом 2–3 мл далее анализируют подходящим способом.

Эфирный экстракт обрабатывают насыщенным раствором бикарбоната натрия, в который переходят вещества кислотной природы. Этот водный раствор экстрагируют диэтиловым эфиром. Полученный экстракт после сушки сульфатом натрия, фильтрации и упаривания до объема 1–3 мл анализируют.

Вторичный эфирный экстракт, содержащий слабокислые и нейтральные вещества, сушат сульфатом натрия, фильтруют, упаривают и далее подвергают химико-аналитическому исследованию.

По такой схеме обрабатывают и подготавливают к анализу пробы тканей мозга, почек, мышечной ткани и других органов трупов людей, гибель которых связывается с потреблением наркотических или допинговых веществ. Аналогичным образом обрабатывают пробы содержимого желудка и кишечника трупов, а также пробы фекалий живых людей и первородного кала (мекония) новорожденных.

Ткани мозга содержат значительное количество фосфолипидов, стероидов, триглицеридов и т.п. В мозговой ткани содержатся низкомолекулярные пептиды, некоторые из которых обладают опийными свойствами. Осложняет извлечение токсичных соединений из мозговой ткани присутствие холестерина (до 5% в сухом веществе), который способен образовывать с водой стойкие эмульсии.

Экстракцию и изоляцию контролируемых веществ из гомогенатов мозгового вещества проводят, как описано выше [9].

Фекалии представляют собой объект химико-аналитического исследования, отличающийся значительным содержанием органических веществ. В эту среду переходят те токсические вещества, которые перерабатываются в печени и переходят в желчь. Кроме того, этот биообъект может содержать токсические вещества, которые не полностью абсорбировались в желудочно-кишечном тракте при оральном введении в организм. Фекалии содержат большое число эндогенных веществ, в том числе желчные кислоты,

стероидные гормоны, сахара, порфирины и продукты их частичной деструкции. Кроме того, этот биообъект отличается наличием разнообразных экзогенных веществ, поступающих с пищей. Это обстоятельство в значительной степени затрудняет как проведение анализов, так и интерпретацию их результатов.

Особое значение для контроля потребления наркотических веществ женщинами в период беременности имеет химико-аналитическое исследование первородного кала новорожденных, называемого меконием [7, 8]. Организм новорожденного выделяет меконий в 1–5 день после рождения, однако накопление этого вещества в организме плода начинается примерно с 16-й недели беременности. В состав мекония входят соли, желчные кислоты, мукополисахариды, липиды, белки, энзимы, элементы крови и эпителиальные клетки. Кроме того, в меконий переходят наркотики и продукты их метаболизма в организме матери и в печени плода. С желчью наркотические средства и продукты их метаболизма поступают в меконий, где накапливаются и сохраняются до рождения ребенка. В результате содержание наркотиков и их метаболитов в меконии может значительно превышать их содержание в крови или в моче ребенка.

Так, например, если мать ребенка в период беременности употребляет морфин или героин, то в меконии ребенка обнаруживают морфин и кодеин как в свободной, так и в конъюгированной форме.

Пробы фекалий и мекония подвергаются быстрым энзиматическим и бактериальным изменениям. Поэтому они должны подвергаться анализу по-возможности как можно быстрее после их отбора. До начала выполнения операций пробоподготовки пробы должны сохраняться в замороженном виде. Кроме того, для консервирования проб применяют лиофильную сушку. Как правило, анализ высушенных проб дает более воспроизводимые результаты [9].

При контроле потребления наркотических веществ большую помощь оказывает анализ выростов кожи – волос и ногтей. Эти биологические материалы могут быть отобраны у живых людей и при этом позволяют получить весьма ценную информацию о потреблении пациентами наркотических и иных токсических веществ.

Волосы, легко доступные для отбора, являются консервативной средой, способной в течение длительного времени сохранять вводимые в организм органические и неорганические токсичные соединения, в том числе наркотики.

Установлено, что в волосах наркоманов в течение длительного времени сохраняются и могут быть обнаружены многочисленные наркотические вещества и соединения, вызывающие токсикоманию и лекарственную зависимость (опиаты, каннабиноиды, кокаин, амфетамин, фенциклидин, метаквалон и др.). Эти вещества, зафиксированные в волосах, растущих на голове и на теле, могут быть обнаружены даже в отдаленные сроки после окончания их приема. При этом данные соединения, сохраняющиеся в волосах, не подвергаются метаболическим изменениям.

Обычно скорость роста волос на голове составляет примерно 1 см в месяц. Это означает, что, оценивая распределение токсичных веществ по длине волос при их длине 6–8 см, можно проследить характер поступления в организм наркотиков и других токсических веществ на протяжении 6–8 месяцев соответственно. Понятно, что по прошествии столь длительного времени анализ биожидкостей уже не сможет дать положительных результатов на наличие наркотиков.

Ногти, как и волосы, в основном, построены из белкового компонента кератина и, как и волосы, могут задерживать в своем составе поступающие в организм токсичные

вещества. Однако интервалы времени, поддающиеся контролю при исследовании вещества ногтей у живых пациентов, естественно, не превышают нескольких дней [10].

Приведенные сведения не исчерпывают всех возможных объектов химико-аналитического исследования на наличие тех или иных контролируемых веществ и продуктов их трансформации в живом организме. Однако описанные в данной главе подходы помогут аналитику, владеющему основными навыками техники химического исследования, скорректировать методику исследования представленного для анализа материала таким образом, чтобы получить надежный и достаточно информативный результат.

Литература

1. Государственная Фармакопея СССР, 10 издание, М.: Медицина, 1968.
2. Drug Abuse Handbook, New York: CRC Press, 1999, pp. 799-857.
3. Handbook of Analytical Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology, Wong S.H.Y., Sunshine I., Eds., Boca Raton, FL: CRC Press, 1996.
4. Recent Developments in Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Sunshine I., Ed., New York: M. Dekker, 1994.
5. Химико-токсикологический анализ веществ, вызывающих одурманивание. Методические указания, М. Минздрав СССР, 1989.
6. Методология химико-токсикологического анализа органических ядов. Выделение и концентрирование. Ч.1. Жидкость-жидкостная экстракция (Изотов Б.Т., Еремин С.К.); Ч.2. Сорбция (Изотов Б.Н., Бурыкина Т.И.). В кн.: Современные методы химико-токсикологического анализа, М.: I ММИ им. И.М. Сеченова, 1986.
7. Becker J., Moore C., Lewis D., J. Clin. Chem., 1995, vol.41, p.144.
8. Moore C., Bull. Internat. Association Forensic Toxicologists. (TIAFT), 1995, vol. 25, no. 4, pp. 24-27.
9. Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В., Анализ наркотических средств, Москва: Изд. «Мысль», 1993, 273 стр.
10. Симонов Е.А., Изотов Б.Н., Фесенко А.В., Наркотики. Методы анализа на коже, в ее придатках и выделениях, Москва: Изд. «Анахарсис», 128 стр.

ГЛАВА 4

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Химическое тестирование чаще всего используется в криминалистике для ускоренного выявления присутствия в исследуемой пробе наркотических веществ в тех случаях, когда подлежащие анализу образцы представляют собой растительные материалы, сигареты, порошки, таблетки, ампульные растворы для инъекций либо лекарственные формы.

Химическое тестирование состоит в том, что препарат, содержащий те или иные наркотики, обрабатывают специальным химическим реактивом, что приводит к появлению окраски, специфической для наркотических веществ определенных групп. В большинстве случаев химические тесты такого рода не являются столь специфическими, чтобы со стопроцентной достоверностью выявить какой-либо один конкретный наркотик. Однако они позволяют судить о наличии в исследуемом образце целой группы веществ, сходных по своему химическому поведению. Поэтому положительные результаты первичного химического тестирования должны обязательно подтверждаться последующим анализом более чувствительными и специфическими методами.

Содержание наркотических веществ в исследуемых препаратах может различаться в очень широких пределах от 100% в чистых препаратах до долей процента в сильно разбавленных («разбодяженных») образцах наркотиков кустарного приготовления или в препаратах, являющихся предметом «уличной» торговли. Кроме того, при тестировании таких образцов следует иметь в виду, что на результаты исследования могут оказывать влияние красители, специально добавляемые в препараты, или окрашенные вещества – компоненты растительного сырья. Результаты химического тестирования могут быть также недостаточно определенными при наличии в исследуемой пробе нескольких наркотических соединений, принадлежащих к разным химическим группам, что характерно для распространяемых на черном рынке наркотических «коктейлей» («спидбол» и др.). Такие пробы обязательно должны подвергаться последующему анализу более чувствительными и специфическими методами.

В тех случаях, когда подлежащий тестовому обследованию образец твердых веществ представляет собой единичную упаковку, ее содержимое тщательно перемешивают для достижения возможно более полной однородности состава (при необходимости с предварительным измельчением). Из однородного материала отбирают для тестирования 2–3 пробы массой 5–10 мг. Если представленный на анализ материал содержится в множественных дискретных формах или упаковках (порошки, таблетки, ампулы, сигареты, «марки»), то исследование проводят следующим образом.

Если число образцов меньше 10, то все они подвергаются тестированию. При числе образцов от 10 до 100 из них выбирают случайным образом и тестируют 10. При числе

образцов, превышающем 100, тестируют случайным образом отобранные пробы, число которых равно квадратному корню из общего их количества.

Для химического тестирования отбирают 2–3 мг порошкообразного или смолистого материала (гашиш, опий и др.). При анализе капсулированных материалов обычно вскрывают одну отобранную случайным образом капсулу или ампулу и подвергают химическому тестированию ее содержимое. При тестировании жидких проб (настои, микстуры, ампульные растворы) химические тесты проводят с объемом жидкости порядка 0,1 мл. При тестировании растительного сырья и сигарет материал тщательно измельчают, отбирают примерно 0,1 г его и подвергают химической обработке. Химическое тестирование должен проводить только специалист. Данные, полученные в результате тестирования, носят оперативный характер и при любом результате (положительном или отрицательном) проверяемые материалы передаются для анализа в криминалистические подразделения. В большинстве случаев химическое тестирование осуществляют на фарфоровых пластинках белого цвета, плоских или с лунками для проб. Применяют также помещенные на белую бумагу стеклянные пластины с лунками или без них, а также небольшие пробирки или фарфоровые либо стеклянные лабораторные чашки, специальные ампулы и даже в ряде случаев полоски фильтровальной бумаги.

Следует иметь в виду, что положительный результат химического тестирования, вообще говоря, не доказывает наличие в испытуемом образце соответствующего наркотического вещества, но в лучшем случае лишь свидетельствует о возможности его присутствия. Поэтому все образцы, показавшие при химическом тестировании положительные (или неопределенные) результаты обязательно должны быть проанализированы более чувствительными и специфическими методами, обсуждаемыми в дальнейших разделах. То же относится и к пробам, дающим отрицательный результат химического тестирования, если имеются те или иные основания подозревать, что в них содержатся наркотические вещества.

Выявление некоторых групп наркотиков с помощью химического тестирования

4.1. Опий (морфин, героин, кодеин)

1. **Реактив Марки:** смесь 40%-го раствора формальдегида и концентрированной серной кислоты (уд. вес 1,84). *Выполнение тестирования:* небольшую пробу тестируемого материала помещают на тестовую пластинку, добавляют 2–3 капли реактива Марки. Появление окраски от фиолетовой до пурпурной показывает возможное присутствие морфина, героина или кодеина.
2. **Реактив Мекке:** 1 г селеновой кислоты H_2SeO_4 растворяют в 100 мл концентрированной серной кислоты (уд. вес 1,84). В лунку тестовой пластинки помещают небольшую пробу тестируемого материала, добавляют 1 каплю раствора H_2SeO_4 и три капли концентрированной серной кислоты. Появление окраски от голубой до зеленой указывает на возможное присутствие морфина, героина или кодеина. Реакция неспецифична, и сходная окраска может появляться в присутствии многих других веществ.

3. **Концентрированная азотная кислота:** при взаимодействии очень малой пробы тестируемого материала с одной каплей концентрированной азотной кислоты происходят следующие изменения окраски:

- появление желтой окраски, медленно переходящей в светло-зеленую, показывает возможное присутствие героина;
- оранжевая окраска, быстро переходящая в красную, а затем в желтую, указывает на возможное присутствие морфина;
- оранжевая окраска, постепенно переходящая в желтую, указывает на возможное присутствие кодеина.

Аналогичные результаты могут получаться и в присутствии довольно значительного числа других химических веществ. Поэтому такой тест не следует считать очень специфичным, хотя он и дает возможность различать присутствие морфина, кодеина и героина.

Следует отметить, что вследствие высокой токсичности и опасных едких свойств применяемых реактивов, эти тесты следует выполнять в условиях стационарной лаборатории, привлекая для этой цели достаточно квалифицированный персонал.

4.2. Каннабиноиды (гашиш)

1. **Выявление присутствия каннабиноидов с использованием красителя «Прочного синего Б»:** хлороводородную соль «Прочного синего Б» смешивают с сульфитом натрия. Небольшое количество получаемой смеси добавляют в пробирку к пробе тестируемого образца. Далее добавляют в пробирку 0,1 н раствор гидроксида натрия. Пробирку встряхивают 2 мин и наблюдают пурпурное окрашивание слоя хлороформа, свидетельствующее о возможном присутствии каннабиноидов.
2. **Обнаружение действием реактива Дюкена–Левина:** в пробирке добавляют к пробе тестируемого материала 2 мл раствора 0,4 г ванилина в 20 мл этанола с добавкой 0,5 г ацетальдегида. Смесь встряхивают 1 мин, добавляют 2 мл концентрированной серной кислоты, перемешивают и оставляют стоять на 5–10 мин. При появлении окраски (~ через 2 мин) добавляют 2 мл хлороформа и осторожно перемешивают смесь. В присутствии гашиша нижний слой хлороформа окрашивается в фиолетовый цвет. Сходную реакцию дают лишь немногие вещества природного происхождения. Поэтому результаты данного теста следует рассматривать как относительно надежные, хотя тем не менее требующие подтверждения более совершенными химико-аналитическими методами.

4.3. Кокаин

1. **Выявление кокаина раствором тиоцианата кобальта:** к небольшому количеству тестируемого материала в пробирке добавляют 1 каплю 16-процентного раствора хлороводородной кислоты, перемешивают и добавляют 1 каплю раствора 2,5 г тиоцианата кобальта (II) в 100 мл воды. Появление голубой окраски указывает на возможное присутствие кокаина. Этот же тест дает положительный результат с различными препаратами кокаина, включая «крэк», однако сходная окраска возникает также и в присутствии ряда синтетических агентов аминной природы, в том числе фенциклидина, метаквалона и ряда других веществ.

2. **Несколько более специфический и чувствительный тест** осуществляется следующим образом: к небольшой пробе тестируемого материала в пробирке добавляют пять капель раствора 1 г тиоцианата кобальта (II) в 50 мл 10%-ной уксусной кислоты с последующим добавлением 50 мл глицерина. Встряхивают пробирку 10–15 с. При наличии в тестируемом материале кокаина возникает голубое окрашивание. Если голубая окраска не появилась, добавляют такое же количество тестируемого материала, как и в начале опыта. Если голубая окраска снова не появится, то, по-видимому, тестируемый материал кокаина не содержит. При появлении голубого окрашивания добавляют небольшое количество концентрированной соляной кислоты. При наличии кокаина раствор приобретает интенсивную фиолетовую окраску. Если окраска мало интенсивна, добавляют еще одну каплю хлороводородной кислоты. Далее добавляют к смеси 5 капель хлороформа. Слой этого растворителя при наличии кокаина окрашивается в фиолетовый цвет. Такую окраску дают лишь очень немногие вещества. Однако среди этих веществ оказываются и весьма важные с точки зрения выявления наркотических препаратов метаквалон и фенциклидин.
3. **Раствор 5 г гидроксида калия в метаноле** вызывает алкоголиз кокаина по бензоильной группе с образованием метилбензоата, обладающего характерным запахом. Для выполнения этого теста в пробирку помещают небольшую пробу тестируемого материала, добавляют 10–15 капель спиртового раствора гидроксида калия, встряхивают пробирку ~10 с, при необходимости подогревают в теплой воде и сравнивают запах выделяющегося из пробирки вещества с запахом заведомого препарата метилбензоата. При сходстве запахов делают заключение о присутствии кокаина в тестируемом материале. Этот тест достаточно специфичен, так как среди контролируемых веществ очень мало примеров соединений, содержащих бензольную группу, кроме кокаина, норкокаина и бензоилэкгонина.

4.4. Барбитураты

1. **Реакция с ацетатом кобальта (реактив Дилль – Конани):** раствор I : 0,1 г тетрагидрата ацетата кобальта растворяют в 100 мл метанола и добавляют 0,2 мл ледяной уксусной кислоты; раствор II : 5 мл изопропиламина растворяют в 95 мл абсолютного метанола. Для выполнения теста помещают в лунку фарфоровой пластинки небольшое количество исследуемого материала и добавляют 3 капли раствора I и 3 капли раствора II. В присутствии барбитуратов появляется красновато-пурпурная окраска. В присутствии метамфетамина появляется желтовато-зеленая окраска. Сходные результаты получаются также и с другими производными и аналогами амфетамина. Хотя эта реакция достаточно специфична для барбитуратов, она не дает возможности различить различные препараты этой группы.

4.5. Вещества группы амфетамина

Присутствие в исследуемом материале амфетамина, метамфетамина (первитина) и других аналогов и производных амфетамина может быть выявлено с помощью следующих тестовых реакций.

1. **Действие реактива Марки:** к небольшой пробе исследуемого материала добавляют 1 каплю реактива Марки. При наличии в исследуемом препарате амфетамина появится оранжевая окраска (изменяется до коричневой). В присутствии метамфетамина появляется желтовато-зеленая окраска. Сходные результаты получаются также и с другими производными и аналогами амфетамина.
2. **Действие реактива Симона:** к небольшому количеству исследуемого материала на фарфоровой пластинке добавляют 1 каплю смеси равных объемов 10%-го раствора ацетальдегида и 1%-го раствора нитропруссиды натрия. Затем прибавляют две капли 2%-го раствора карбоната натрия. В присутствии метамфетамина (первитина) возникает голубая окраска. Если вместо ацетальдегида используют раствор 1 г нитропруссиды натрия в 100 мл 5%-ного водного ацетона, то в присутствии амфетамина появляется пурпурная окраска.

Эти тестовые реакции могут иметь лишь ориентировочное значение и их результаты должны обязательно подтверждаться более чувствительными и специфическими аналитическими методами.

4.6. Обнаружение фенциклидина и метаквалона

В пробирку помещают небольшое количество испытуемого материала и добавляют 1 каплю 15%-ной хлороводородной кислоты и 1 каплю 2,5%-ного водного раствора тироцианата кобальта (II). При наличии метаквалона или фенциклидина возникает голубое окрашивание. Сходный результат получается и в присутствии кокаина.

4.7. Метадон

1. Наличие этого наркотического вещества может быть выявлено добавлением к пробе исследуемого материала 2 капель концентрированной азотной кислоты и 10 капель концентрированной серной кислоты. При наличии метадона возникает оранжевая окраска, постепенно переходящая в красную. Этот тест несколько более специфичен, однако так же, как и предыдущий, требует обязательного подтверждения более специфическими аналитическими методами.

4.8. Производные 1,4-бензодиазепина

Наличие производных 1,4-бензодиазепина в исследуемом материале может быть выявлено с помощью следующих простых тестовых реакций.

1. **Реактив Витали-Моррена:** к небольшой пробе испытуемого материала в пробирке добавляют 0,5 мл концентрированной азотной кислоты и смесь упаривают досуха на водяной бане (в вытяжном шкафу). Затем добавляют 5 мл ацетона и 1 мл 0,1 М раствора гидроксида калия в этаноле. Появление желтой окраски указывает на возможное присутствие производных 1,4-бензодиазепина. При выполнении этой

реакции следует иметь в виду, что желтое окрашивание с концентрированной азотной кислотой могут давать также и многие амины, пептиды и вещества белкового характера (ксантопротеиновая реакция).

2. Желтая окраска в присутствии производных 1,4-бензодиазепина образуется также и при добавлении к пробе испытуемого материала 2 капли концентрированной хлороводородной кислоты. К сожалению, такую же окраску могут дать и многие другие вещества.
3. Реактив Циммермана: раствор 1 г 2,4-динитробензола в 100 мл метанола добавляют в количестве 1–2 капель к пробе испытуемого материала на фарфоровой пластинке. Затем добавляют 1 каплю 15%-го водного раствора гидроксида калия. В присутствии производных 1,4-бензодиазепина появляется красновато-пурпурная или темно-фиолетовая окраска.

Этот тест также не слишком специфичен, т.к. сходные результаты дают и многие другие азотсодержащие соединения.

При проведении мероприятий по обнаружению и изъятию наркотических средств из незаконного оборота важную роль играет их быстрое выявление в исследуемой выборке объектов. В силу специфических особенностей наркотиков для решения поставленной задачи необходимо привлечение специальных технических средств. Наиболее простыми из них являются наборы химических реактивов, общепринятыми требованиями для которых являются отсутствие операций, требующих специальной лабораторной техники: нагревания, фильтрования, экстракции с точным разделением слоев жидкости, центрифугирования и др. Обычно тесты состоят из заранее приготовленных реагентов, сохраняющих свои свойства в течение длительного времени и в широком диапазоне климатических условий. Указанными тестами могут проводить исследования лица без специальной химической подготовки и специальных защитных приспособлений (защитная одежда, очки, перчатки и др.).

Однако следует иметь в виду, что результаты, полученные рассматриваемым методом, имеют предварительное значение, учитывая недостаточную избирательность цветных реакций. Это объясняется огромным числом существующих соединений и разнообразием их строения, причем большинство органических соединений имеет ряд аналогов и гомологов, и когда какая-либо группа может быть идентифицирована соответствующей реакцией, то такую же реакцию могут давать ее аналоги и гомологи, образующие аналогичные продукты реакции.

Наборы капельного типа предназначены для проведения анализа на фарфоровых и стеклянных пластинках с углублениями (плашках), куда помещают образцы объектов, которые затем обрабатываются реагентами с помощью пипеток или капельниц. Наиболее известным комплектом реагентов капельного типа является набор, описанный в руководстве для национальных лабораторий, разработанном по программе борьбы с незаконным оборотом наркотиков ООН.

Аэрозольные наборы предназначены для проведения анализа на фильтровальной или хроматографической бумаге, на которую помещаются испытуемые объекты с последующим опрыскиванием цветными реагентами из аэрозольных баллончиков. Наиболее известными тестами аэрозольного типа являются тесты на героин, кокаин, бабитураты и каннабиноиды.

Ампульные тесты предназначены для проведения анализа путем механического раздавливания стеклянных ампул с реагентами в прозрачных реакционных контейнерах,

полимерных пакетах или трубках. Это наиболее распространенный на практике тип наборов.

В качестве скринингового (предварительного) исследования наркотических средств в биосредах применяются также различные методы иммуноанализа, такие как ИФА, РИА, ПФИА, основанные на принципе конкуренции между определяемым веществом в образце (моча, кровь) и меченым веществом за ограниченное число мест связывания антител, специфичных к данному веществу.

Флуоресцентно-поляризационный анализ измеряет комплекс метка-антитело прямо в растворе, используя особые свойства красителя-флуоресцеина. Вещество, которое надо определить метится флуоресцеином. Метка, когда возбуждается линейно-поляризованным светом, флуоресцирует со степенью поляризации обратно пропорциональной скорости вращения. Скорость вращения свободной метки за время поглощения и излучения велика, следовательно значение поляризации будет стремиться к нулю, а при связывании с антителами поляризация возрастает вследствие замедления вращения. Немеченое вещество, присутствующее в образце пациента, конкурирует с меткой при связывании антител. Если образец содержит вещество в высокой концентрации, то наблюдаемое значение поляризации близко к тому, которое имеет свободная метка.

В иммуноферментных методах в качестве метки используются ферменты, которые окисляют специальное химическое вещество – хромогенный субстрат, образуя окрашенные растворы. В качестве таких ферментов применяются главным образом различные оксидазы. В результате реакции с антителами происходит образование окрашенных продуктов. Наличие или отсутствие вещества оценивается по интенсивности окраски.

Данные, полученные в результате скринингового исследования, как уже говорилось выше, обязательно следует подтверждать более чувствительными и специфичными методами анализа.

Литература

1. Машковский М.Д., Лекарственные средства, Вильнюс: ЗАО «Гамта», 1994, 920 с.
2. Шрайнер Р., Фьюзон Р., Кёртин Д., Морилл Т., Идентификация органических соединений, М.: «Мир», 1983, 703 с.
3. Ерёмин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В., Анализ наркотических средств, М.: «Мысль», 1993, 271 с.
4. Симонов Е.А., Изотов Б.Н., Фесенко А.В., Наркотики. Методы анализа на коже, ее придатках и выделениях. М.: ООО «Анарсис», 2000, 130 с.
5. Симонов Е.А., Найденова Л.Ф., Ворнаков С.А., Наркотические средства и психотропные вещества, контролируемые на территории Российской Федерации, М.: «InterLab», 2003, 411 с.
6. Федоров Л.А., Диоксины как экологическая опасность, М.: «Наука», 1993, 266 с.

ГЛАВА 5

СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НАРКОТИЧЕСКИХ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ И ДОПИНГОВЫХ ВЕЩЕСТВ

5.1. Введение

Большинство наркотических, лекарственных и допинговых веществ содержит в составе своих молекул циклические ароматические системы и функциональные группы, способные к поглощению лучистой энергии в УФ-и ИК-диапазонах. Это отражается в их спектрах в форме характерных для тех или иных веществ максимумов поглощения. Во многих случаях установить молекулярную структуру и доказать тождество более или менее чистых препаратов помогают методы протонного магнитного резонанса и ядерного магнитного резонанса на ядрах ^{13}C . Однако вследствие дороговизны и относительно малой доступности аппаратуры для этих достаточно сложных физических методов исследования их довольно редко применяют для анализа наркотических и допинговых средств. Тем не менее ряд сведений об этих мощных аналитических методах можно почерпнуть в монографиях [1, 2].

Более доступными для большинства контрольно-аналитических лабораторий оказываются методы УФ- и ИК-спектроскопии. Первый из этих методов получил в последние десятилетия весьма широкое распространение благодаря внедрению в аналитическую практику совершенных приборов для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием определяемых компонентов (см. ниже, гл. 6 и 7). Эти приборы в своем большинстве позволяют не только зарегистрировать факт присутствия тех или иных подлежащих контролю веществ в анализируемой пробе, но также дают возможность получить их УФ-спектры, обычно в спектральном диапазоне от 190 до 360 нм. Метод УФ-спектроскопии обеспечивает достаточно высокую чувствительность определения (менее 100 мкг/мл) и позволяет с достаточной определенностью идентифицировать весьма значительное число наркотических, лекарственных и допинговых веществ.

Методике и технике обсуждаемых спектральных методов посвящен ряд весьма детальных монографий и пособий, например [3–6]. Спектральные характеристики многих подлежащих химико-аналитическому контролю веществ приведены в книгах, специально посвященных методам их определения [7–9]. Кроме того, в литературе имеется ряд обзоров и сводок экспериментальных данных по этим видам спектроскопии, например [10–12]. В последней из этих сводок приведены данные об УФ-спектрах более 260 физиологически активных веществ, в том числе наркотиков и лекарственных препаратов. Метод ИК-спектроскопии чаще всего применяется в практике химико-аналитического контроля наркотических и допинговых средств для установления молекулярного строения исследуемых соединений, выделенных в достаточно чистом виде. Модификации

ИК-спектроскопического метода, позволяющие выполнять быструю регистрацию спектров (за 1–2 с), используются в сочетании с хроматографическими методами анализа (см. ниже, гл. 6–9). В этих модификациях используется математическая операция, называемая Фурье-преобразованием, что и определило наименование данного метода как ИК-Фурье-спектроскопия [13–14]. К сожалению, обычные варианты ИК-спектроскопии не обеспечивают достаточно высокой чувствительности анализа. Поэтому их роль в выявлении наличия наркотических и допинговых средств в сложных биологических матрицах достаточно ограничена.

5.2. Спектроскопическое определение барбитуратов

УФ-спектры большого числа производных барбитуровой кислоты сходны между собой вследствие наличия в их молекулах аналогичного шестичленного цикла, способного взаимодействовать с УФ-излучением. Характер УФ-спектров этих соединений зависит от pH среды и сильно различается при значениях $\text{pH} < 7$ и при $\text{pH} = 8\text{--}13$. При $\text{pH} < 7$ неионизированные формы барбитуратов не имеют выраженных максимумов поглощения в диапазоне длин волн 200–330 нм. При $\text{pH} 8\text{--}9$ в УФ-спектрах барбитуратов появляется максимум поглощения при 238–240 нм, который отвечает соединениям, образующимся в результате первой стадии ионизации. Наконец, при более высоких значениях $\text{pH} > (10\text{--}11)$ происходит вторая стадия ионизации, и в спектрах дважды ионизированных форм барбитуратов появляются максимумы поглощения при 254–260 нм. Процессы ионизации барбитуратов представлены на схеме 5.1, а типичные УФ-спектры этих соединений представлены на рис. 5.1 [7].

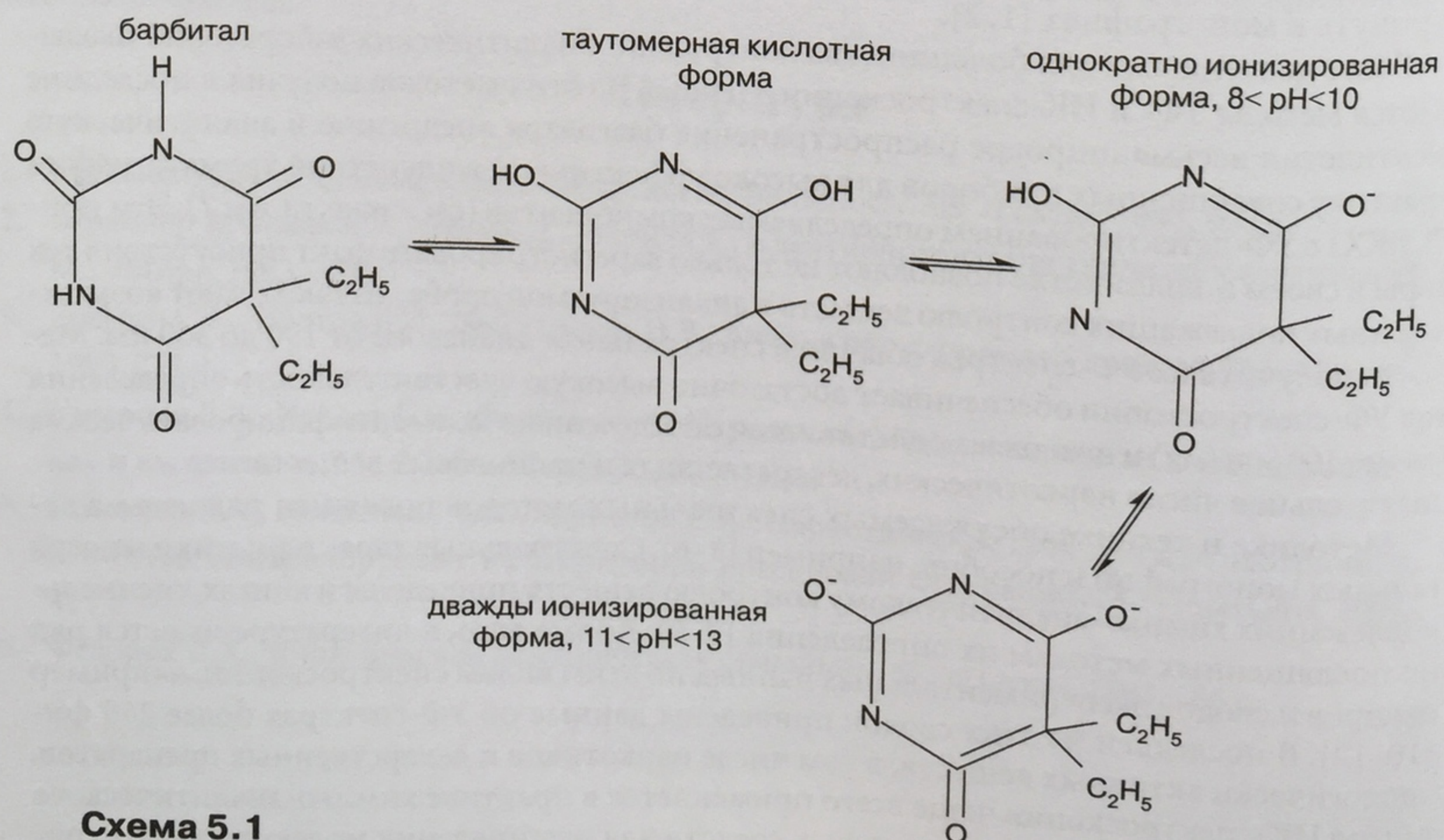
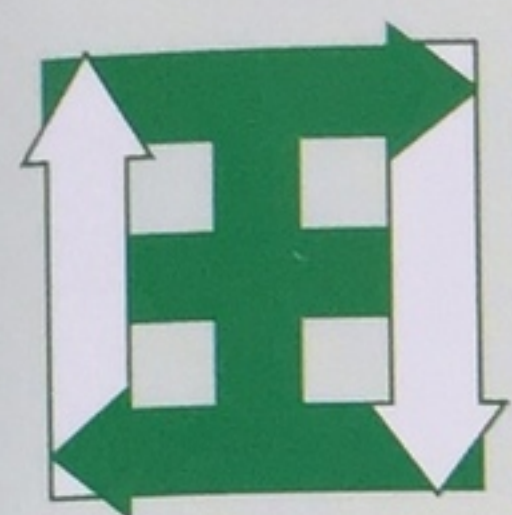


Схема 5.1



®

ФАКТОР-МЕД

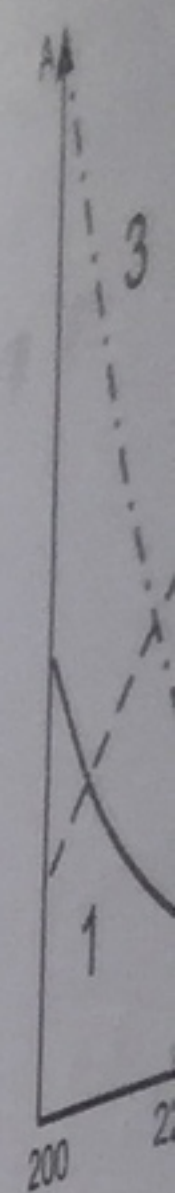
Российский производитель диагностических тестов

Тесты

для выявления

наркотических веществ
и инфекционных заболеваний

Тел.: +7 (495) 956 75 85, www.faktor.ru



Для неко
тов в табл. 5
значениях р
УФ-спектры
приведены н

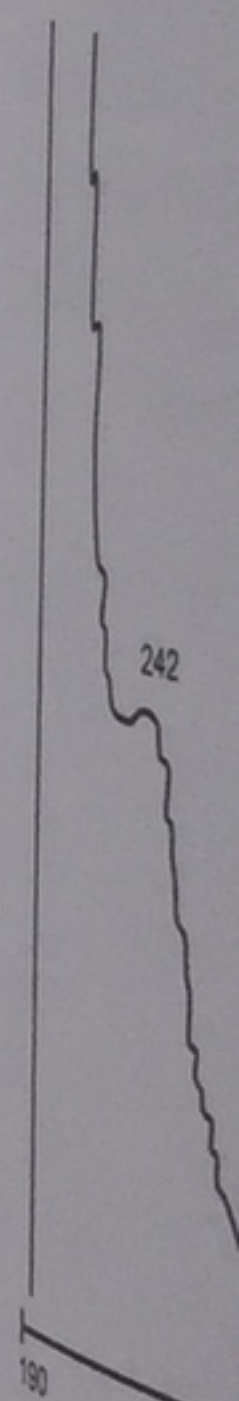


Рис. 5.2. УФ-с
длин волн 200

Таблица

Барбитал	Н
Фенобарбит	
Циклобарбит	
Барбарбит	
Этамил	
Этамил на	

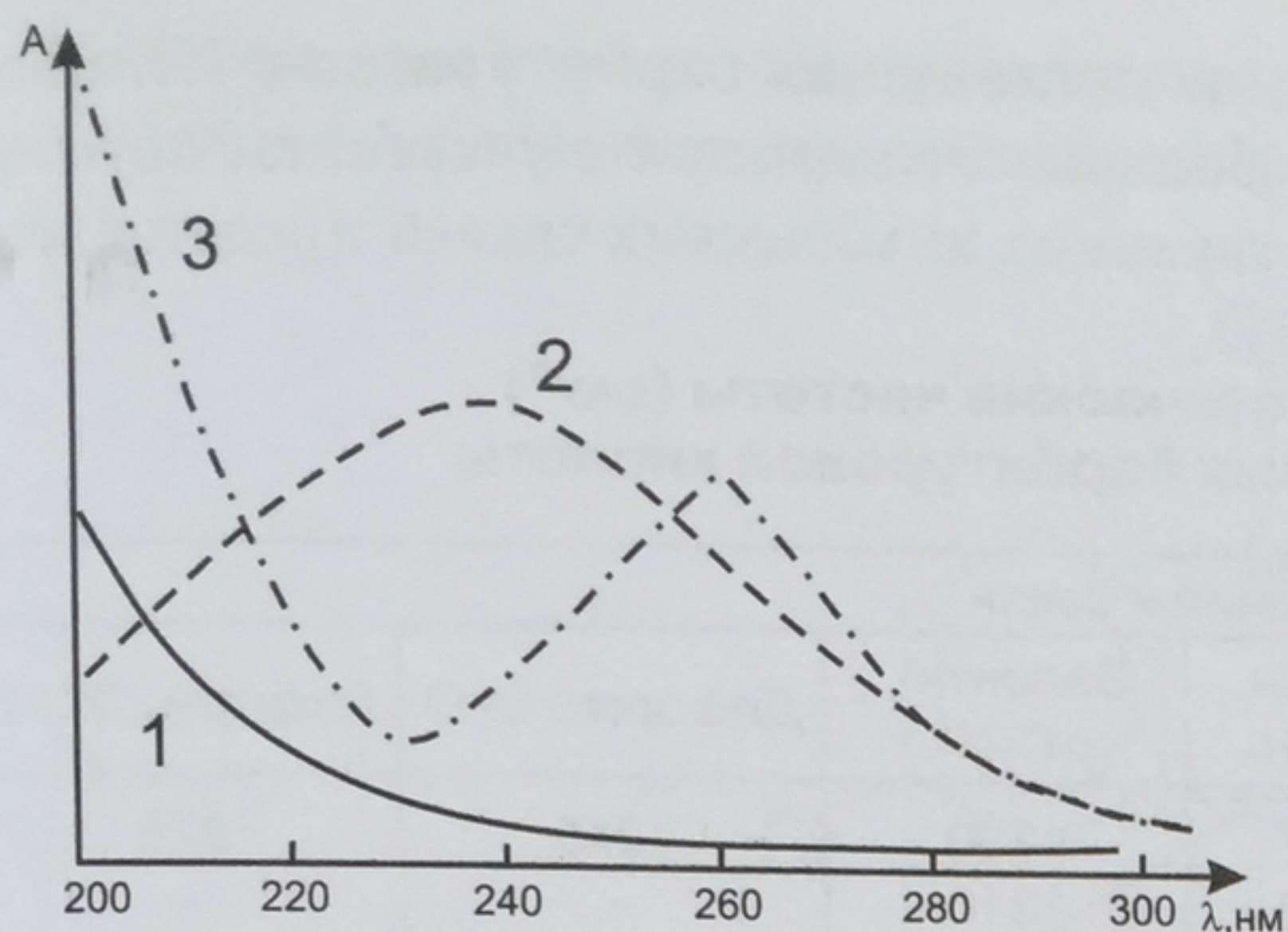


Рис. 5.1. УФ-спектры барбитуратов при разных значениях pH: 1 – pH = 7; 2 – pH = 9.2; 3 – pH = 13

Для некоторых наиболее часто встречающихся представителей группы барбитуратов в табл. 5.1 приведены характерные длины волн максимумов поглощения при двух значениях pH, соответствующих первой и второй ступеням ионизации, а типичные УФ-спектры фенобарбитала и этаминала натрия в диапазоне длин волн 200–360 нм приведены на рис 5.2 и 5.3.

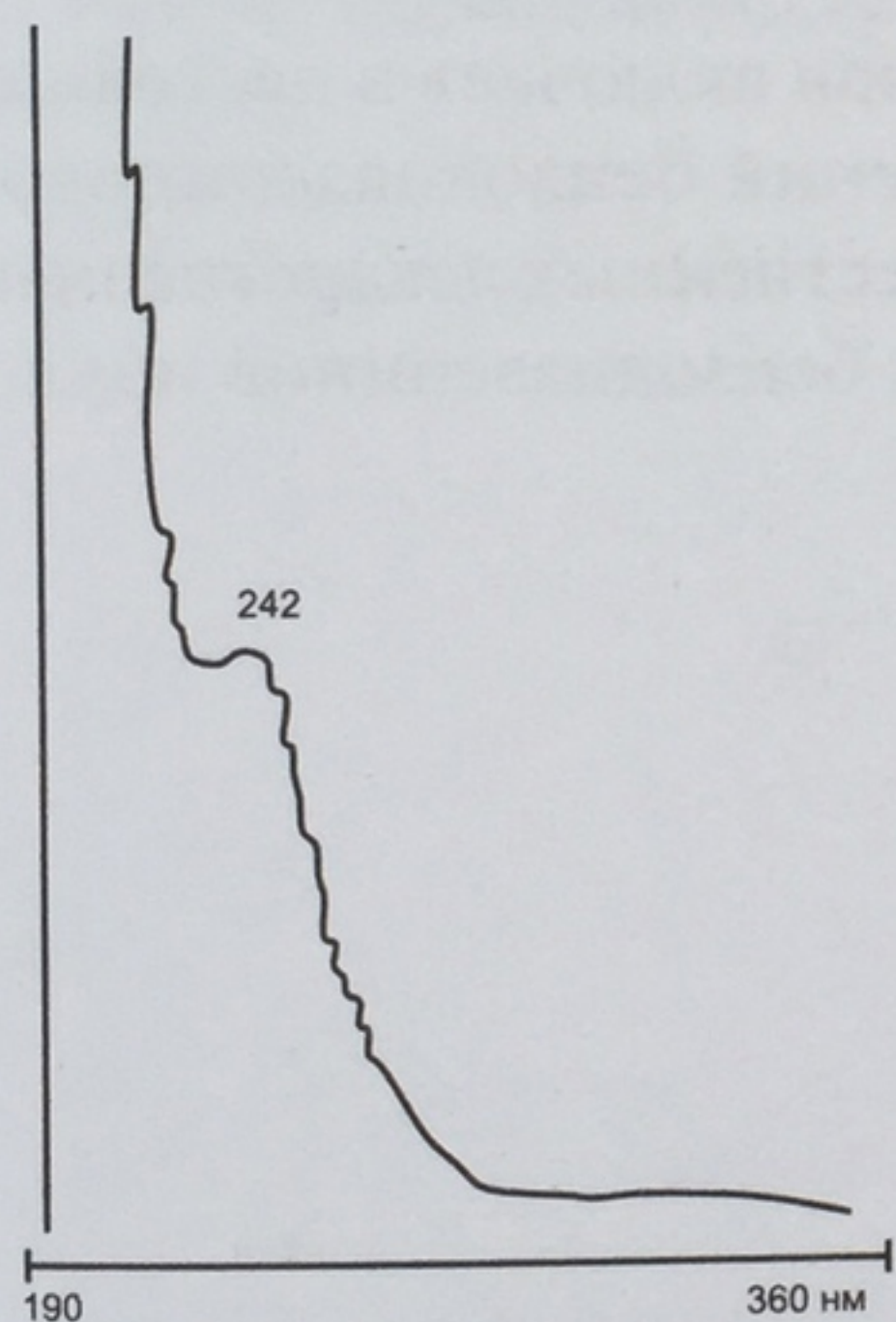


Рис. 5.2. УФ-спектр фенобарбитала в диапазоне длин волн 200–360 нм. Время регистрации 1 с.

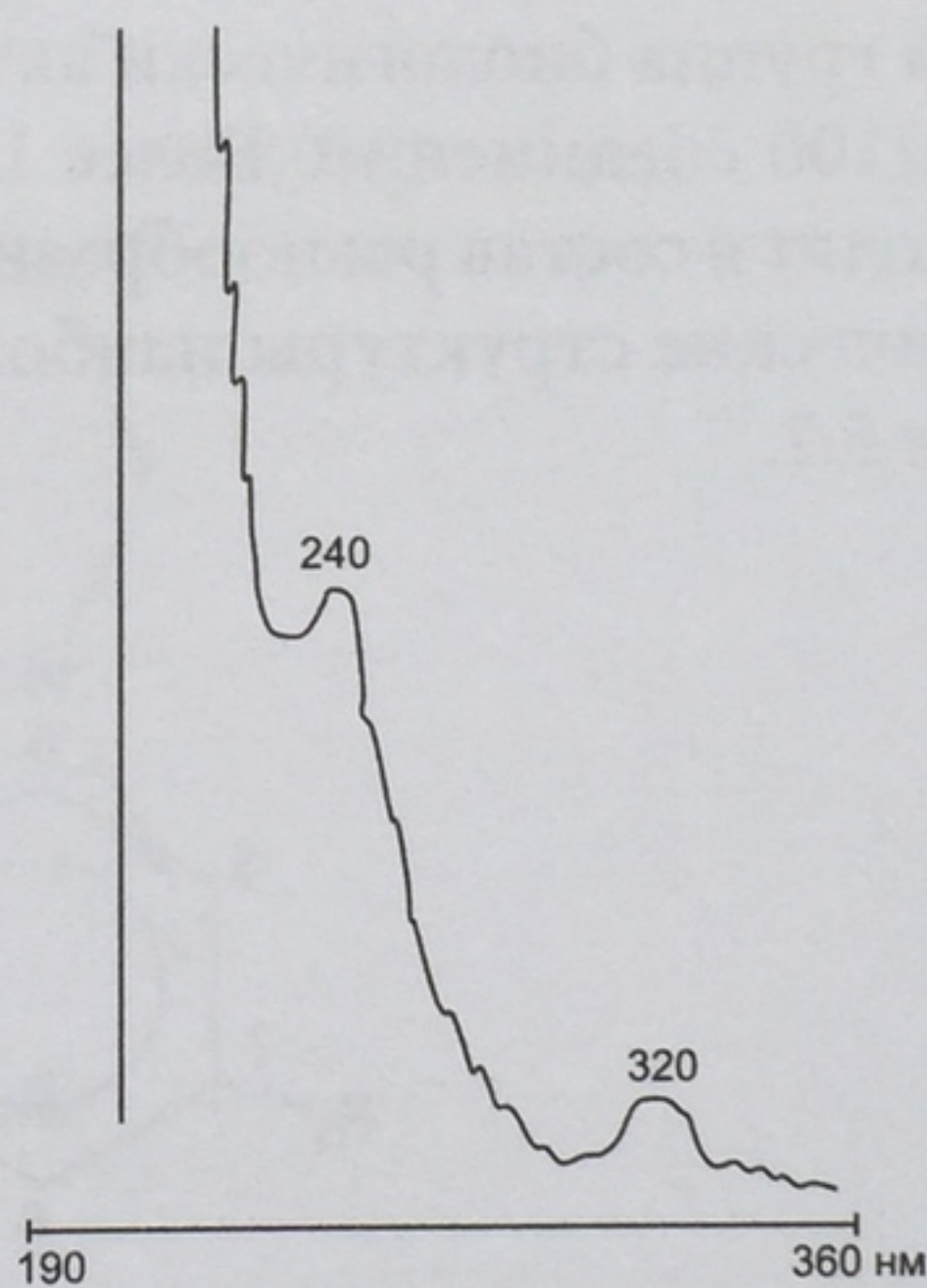


Рис. 5.3. УФ-спектр этаминала натрия в диапазоне длин волн 200–360 нм. Время регистрации 1 с.

Таблица 5.1. Характерные максимумы поглощения (λ_{max} , нм) в УФ-спектрах наиболее часто встречающихся барбитуратов

Наименование	pH = 9,2	pH = 13
Барбитал	239	254
Фенобарбитал	239	254
Циклобарбитал	240	243
Барбамил	240	255
Этаминал натрия	239	255

Характеристические частоты максимумов поглощения барбитуратов в ИК-спектрах различаются между собой несколько больше. Эти данные с указанием обуславливающих их типов колебаний и соответствующих химических связей представлены в табл. 5.2.

Таблица 5.2. Характеристические частоты (см^{-1}) в ИК-спектрах производных барбитуровой кислоты

Типы колебаний и связи						
Наименование соединения	Деформ., -NH-	Валентн., C=O	Валентн., -CONH-	Валентн., >C-N<	Деформ., C=O	Деформ., >C-H
Барбитал	1680	1720	1767	1320	1245	875
Фенобарбитал	1684	1712	1770	1310	—	—
Циклобарбитал	1693	1725	1745	1300	1210	830
Барбамил	1685	1719	1744	1315	1218	845

Сходный ИК-спектр имеет и этаминал натрия.

5.3. Спектральные характеристики 1,4-бензодиазепинов и продуктов их разложения – замещенных бензофенонов

Обширная группа биологически активных бензодиазепинов включает в настоящее время более 2100 соединений. Более 100 различных соединений бензодиазепиновой структуры входят в состав разнообразных импортных и отечественных лекарственных средств. Химические структуры наиболее распространенных бензодиазепинов приведены на схеме 5.2.

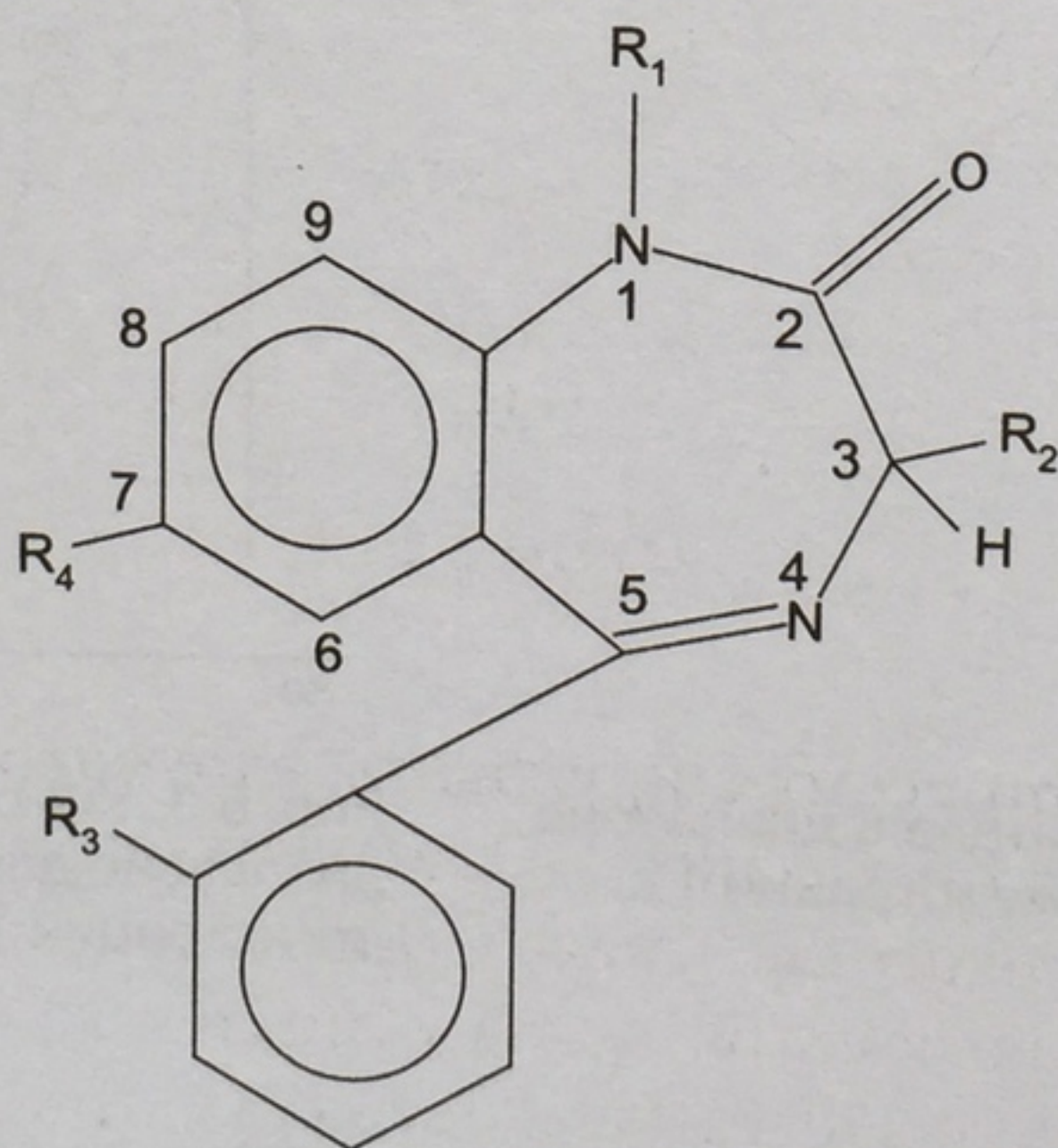


Схема 5.2

Наименование	R1	R2	R3	R4
Гидазепам	-CH ₂ -C(=O)-NH-NH ₂	H	H	Br
Диазепам (сибазон)	CH ₃	H	H	Cl
Нитразепам	H	H	H	NO ₂
Оксазепам	H	OH	H	Cl
Феназепам	H	H	Cl	Br

Несколько отличаются химические структуры ряда распространенных антидепрессантов ряда 1,4-бензодиазепинов, например, медазепам (схема 5.3).

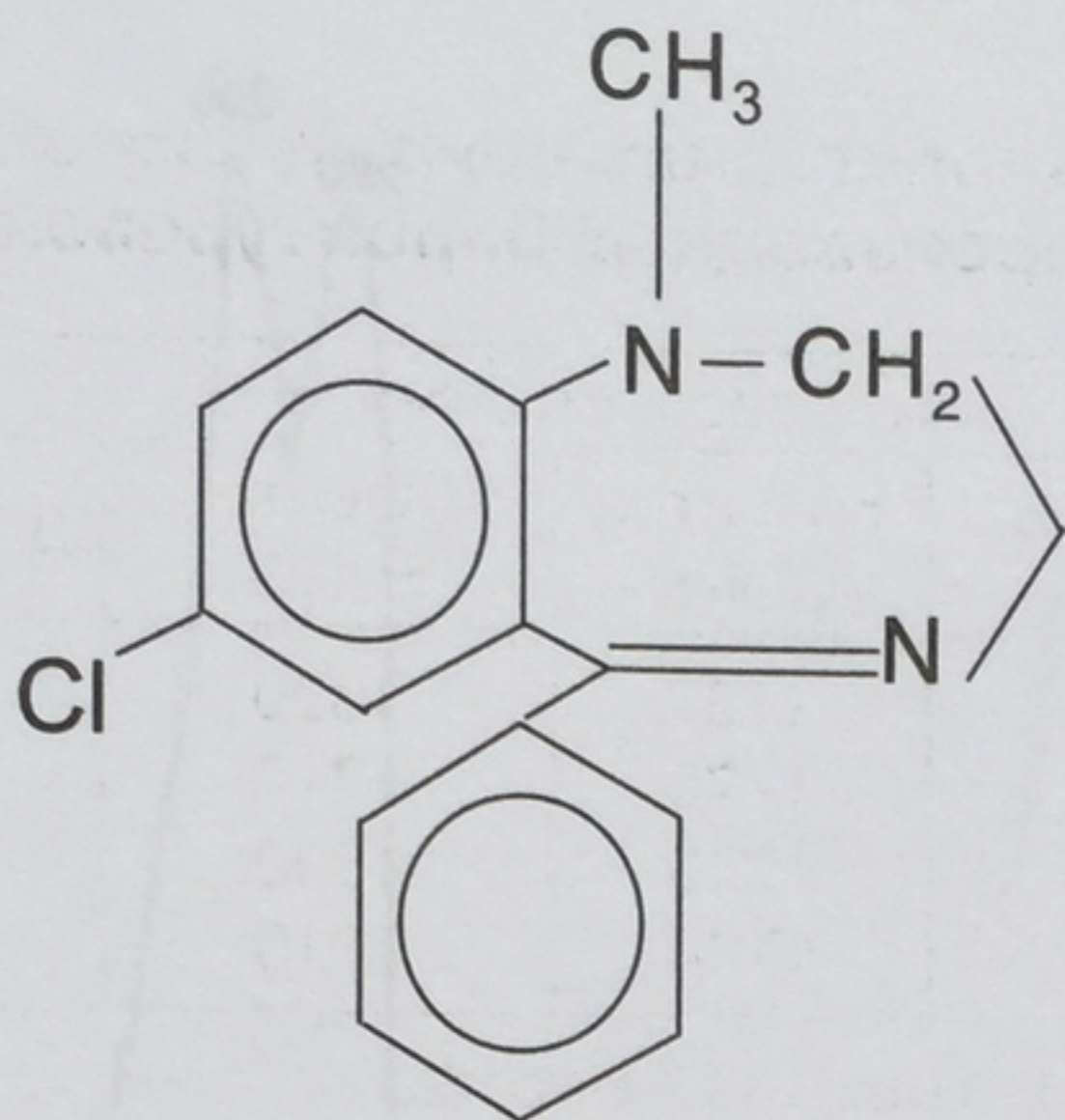


Схема 5.3

или хлордiazепоксид (хлорзепид) схема 5.4.

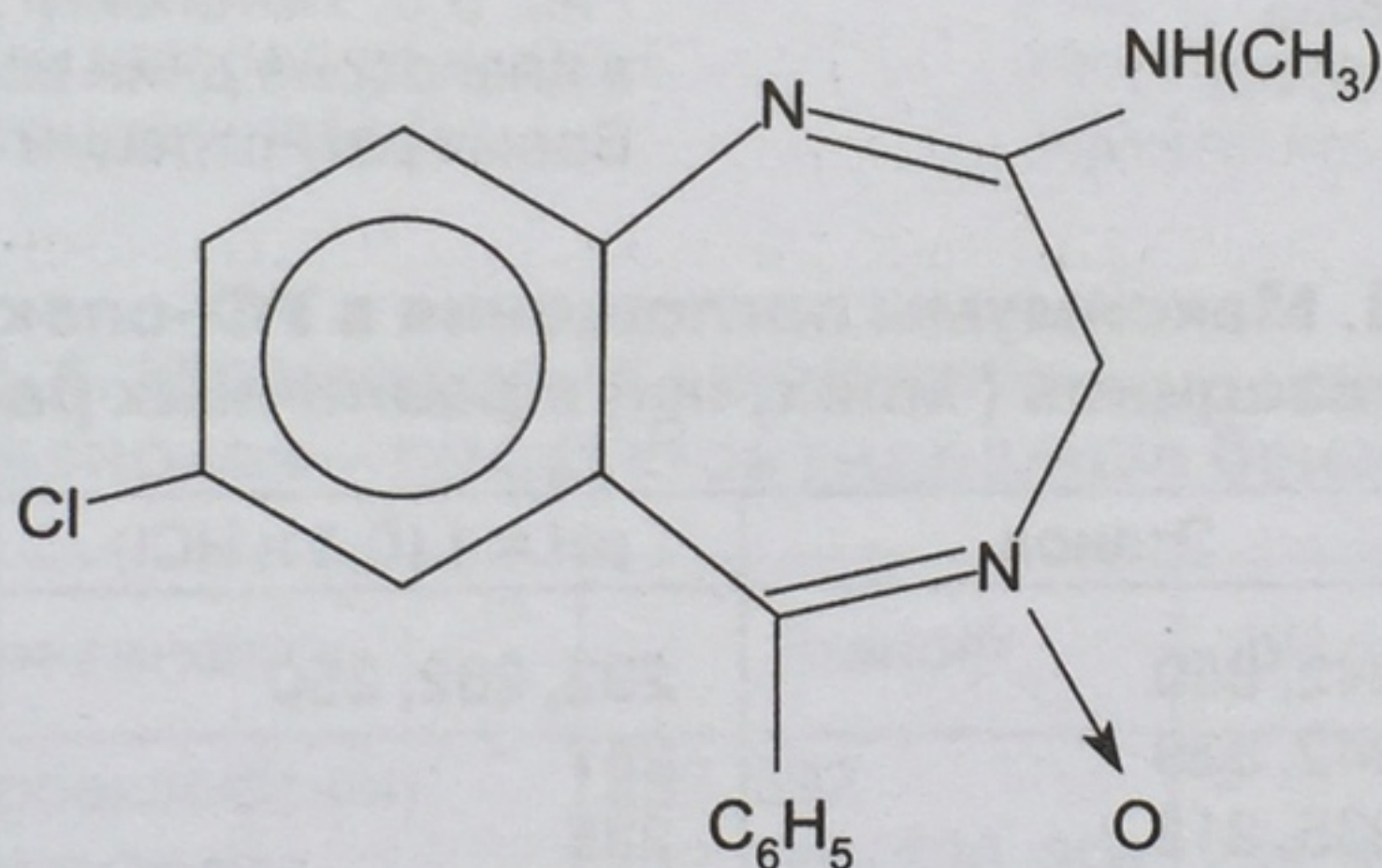


Схема 5.4

Распространяющиеся по всему миру факты злоупотребления бензодиазепинами послужили основанием для Комиссии ООН по наркотикам отнести в 1984 г. эту группу химических соединений к веществам, находящимся под международным контролем.

В УФ-спектрах производных 1,4-бензодиазепина наблюдаются три максимума поглощения при 200–215, 220–240 и 290–330 нм. Две первые полосы отвечают возбуждению ароматических хромофоров, а третью полосу связывают с колебательным возбуждением азометиновой группы. Характер спектров бензодиазепинов изменяется в зависимости от pH раствора, в котором снимают спектр. Так, при pH=1 отмечается bathochromic сдвиг длинноволновой полосы ряда бензодиазепинов, а при pH=8 наблюдается гипсохромный сдвиг некоторых полос в спектрах 1,4-бензодиазепинов. В кислой среде изменения в УФ-спектрах связывают с протонированием атомов азота диазепинового цикла, а в щелочной среде – с лактим-лактаманной таутомерией азометиновой структуры и связанным с ней увеличением цепи сопряжения хромофоров.

Длины волн максимумов поглощения некоторых бензодиазепинов в этаноле и в кислых и щелочных растворах приведены в табл. 5.3, а УФ-спектры нитразепама и хлордiazепоксид (хлосепина) в диапазоне длин волн 180–360 нм приведены на рис. 5.4 и 5.5.

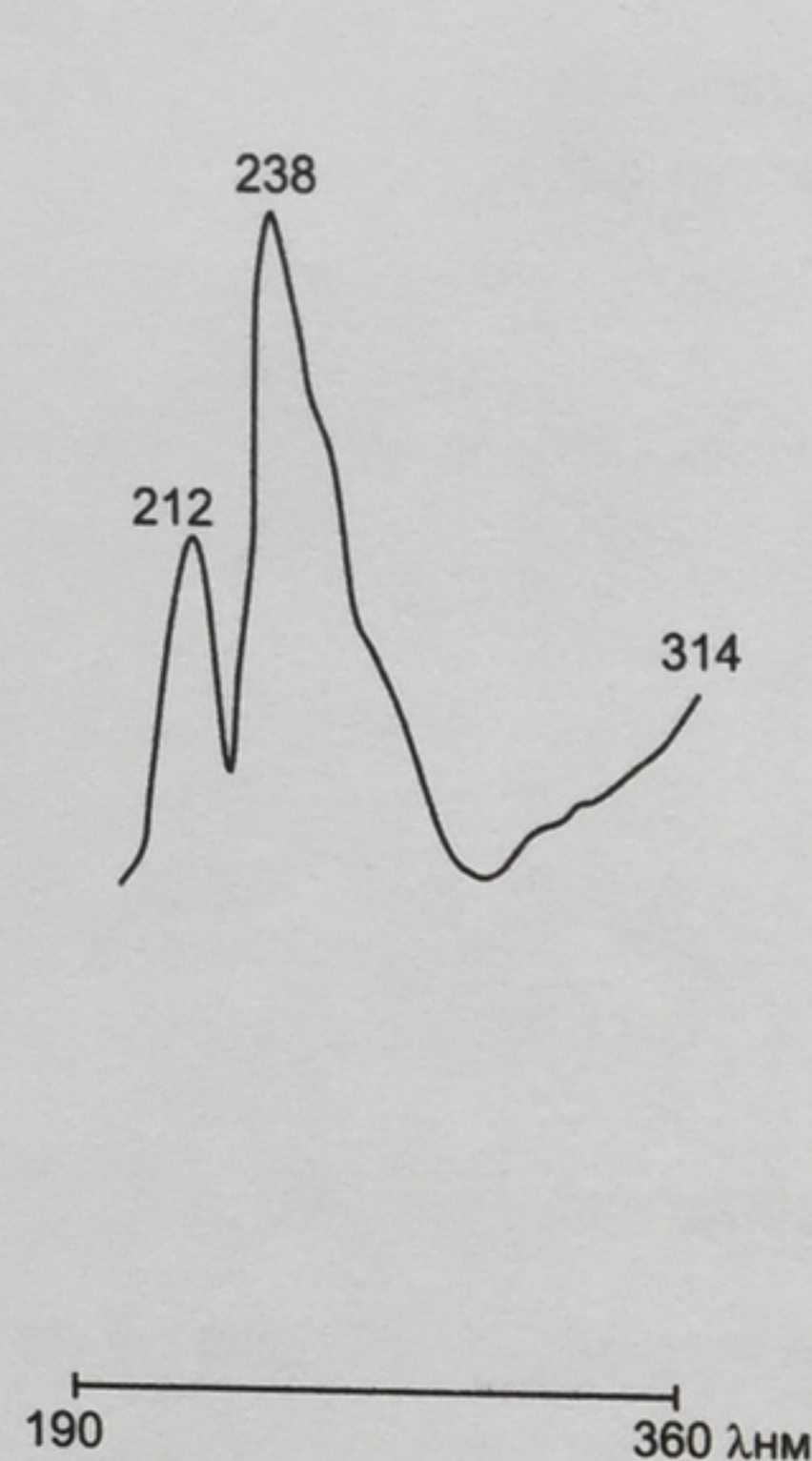


Рис. 5.4. УФ-спектр нитразепама в диапазоне длин волн 180–360 нм. Время регистрации 1.2 с.

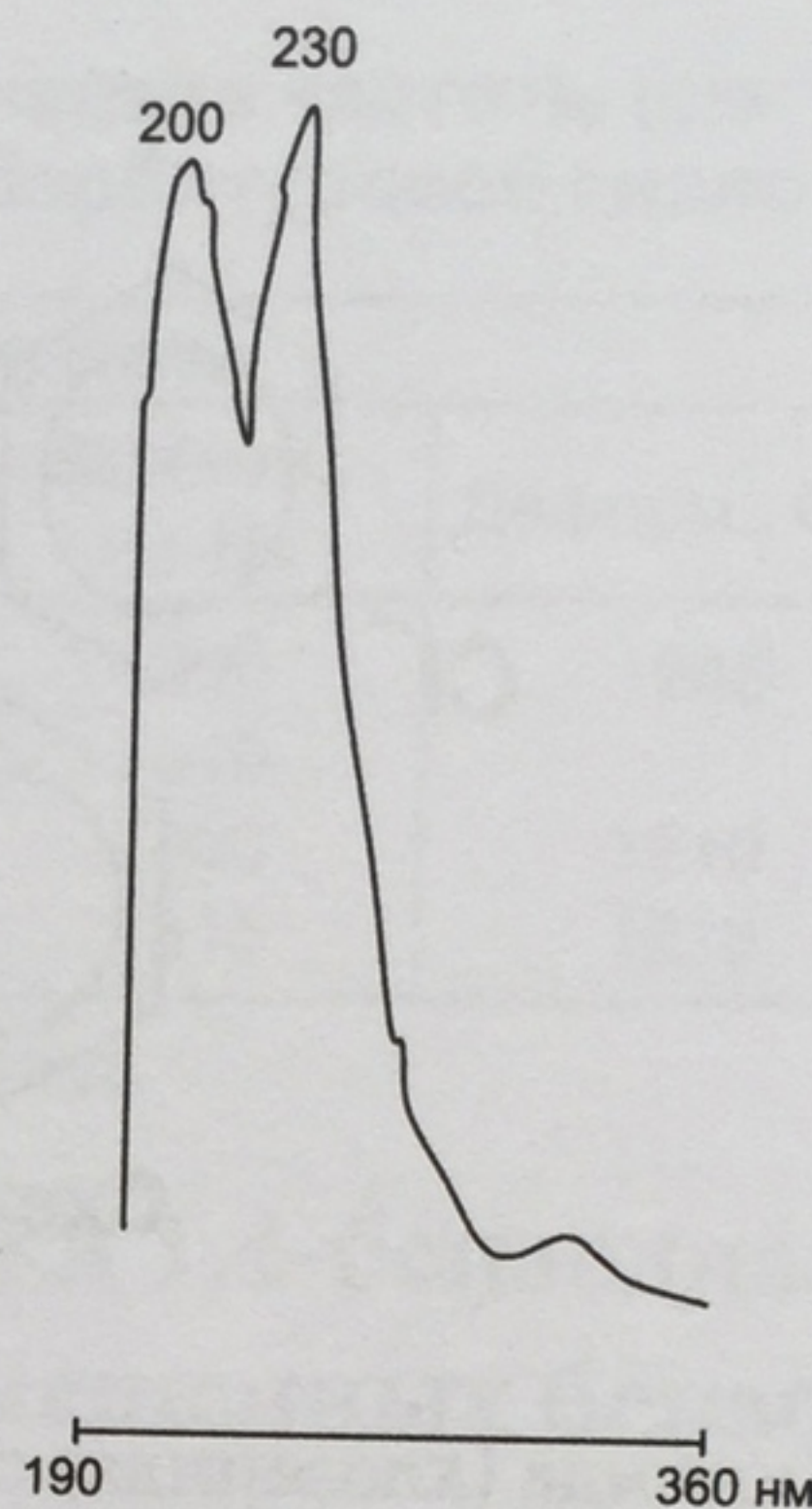


Рис. 5.5. УФ-спектр хлордiazепоксид в диапазоне длин волн 190–360 нм. Время регистрации 1.2 с.

Таблица 5.3. Максимумы поглощения в УФ-спектрах некоторых бензодиазепинов (λ_{max} , нм) в различных растворителях

Наименование соединения	Этанол	pH = 1 (0,1 н HCl)	pH = 8 (0,1 н NaOH)
2-Аминонитразепам	242, 350	232, 282, 350	238, 350
2-Ацетамидонитразепам	242, 330	257	237
Демоксепан	235, 312	235	243, 257
1,1'-Диметилхлосепид	242, 363	246, 310	258
Лоразепам	229, 322	230	234, 349
Мезепам	231, 252, 360	254	—
Нозепам	229, 324	234, 281	234, 340
Нитразепам	220, 258, 312	280	226, 258, 357
Нордiazепам	228, 325	232, 282, 370	340
3-Оксисибазон	231, 255, 315	235, 283, 355	—
Сибазон	230, 255	241, 285, 360	229
Феназепам	230	241	—
Хлосепид	245, 267	245, 310	261

Преобладающими процессами биотрансформации 1,4-бензодиазепинов, протекающими с разными скоростями как в живом организме, так и в трупном материале, является гидролиз с образованием соответствующих замещенных бензофенонов. Эти соединения могут быть обнаружены разнообразными методами, в том числе и спектральными, в самых разнообразных материалах (моча, сыворотка крови, трупные материалы, ткани и органы). Эти вещества имеют весьма характерные максимумы поглощения в УФ-спектрах, что позволяет надежно идентифицировать факты употребления бензодиазепинов.

В табл. 5.4 приведены данные о длинах волн максимумов поглощения в УФ-спектрах некоторых из таких замещенных бензофенонов в нейтральной, кислой и щелочной средах. Примеры соответствующих спектров приведены на рис. 5.6 и 5.7, заимствованных из книги [7].

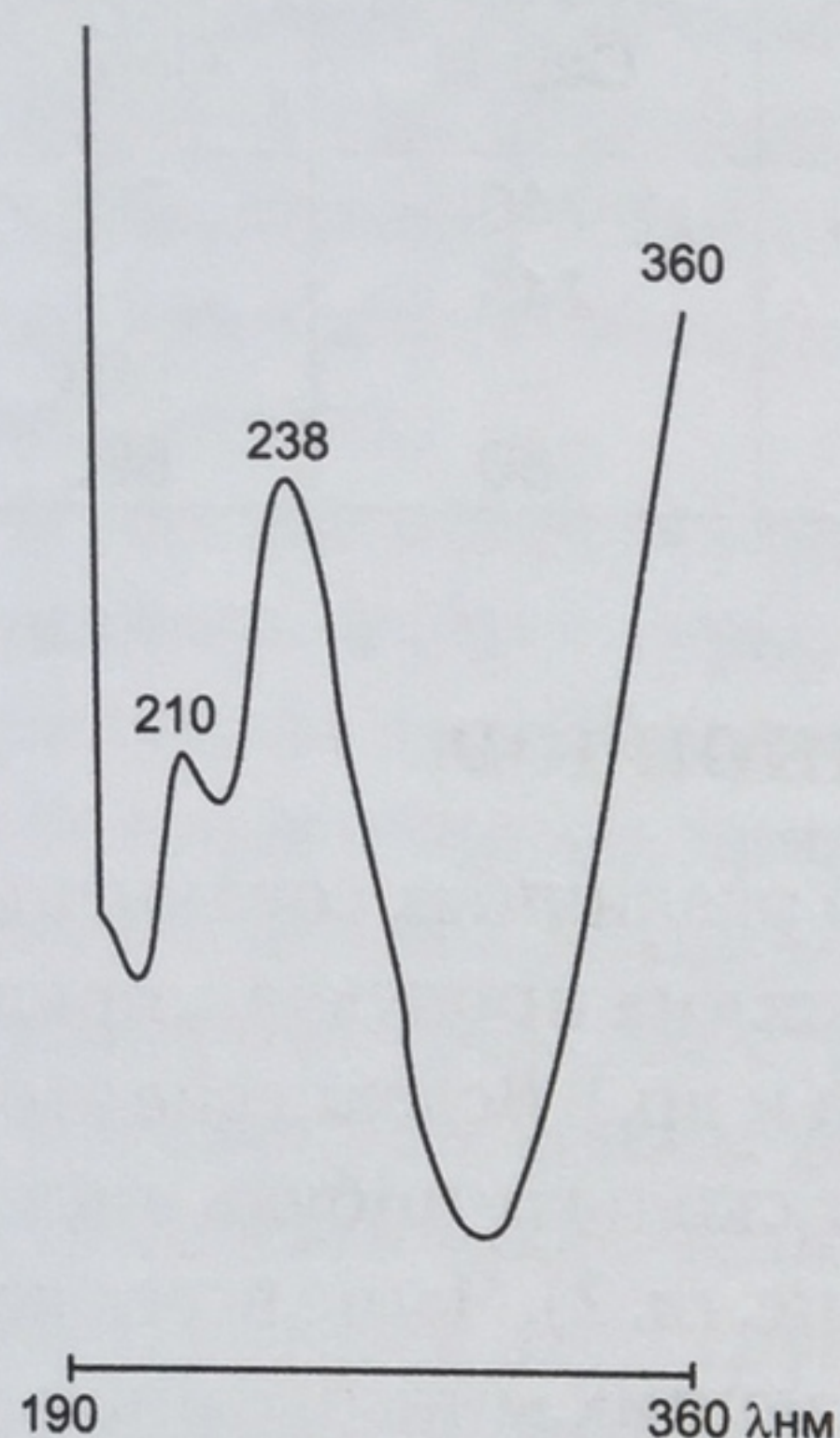


Рис. 5.6. УФ-спектр 2-амино-5-нитробензофенона в диапазоне длин волн 190-360 нм. Время регистрации 1.2 с.

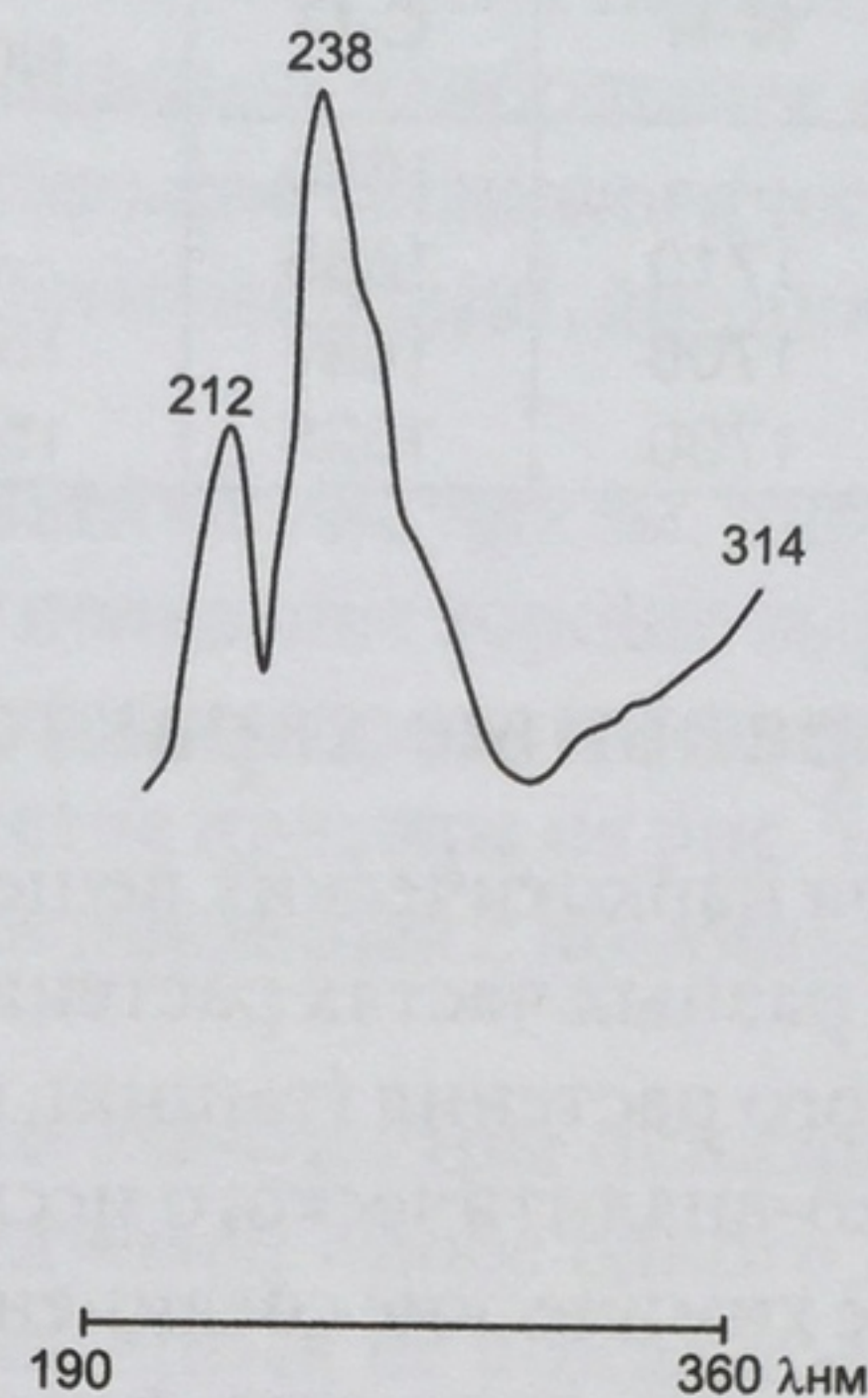


Рис. 5.7. УФ-спектр 2-амино-5-хлорбензофенона в диапазоне длин волн 190-360 нм. Время регистрации 1.2 с.

Таблица 5.4. Максимумы поглощения (λ_{max} , нм) в УФ-спектрах бензофенонов – продуктов гидролиза бензодиазепинов

Наименование соединения	Этанол	pH = 1 (0,1 н HCl)	pH = 8 (0,1 н NaOH)
2-Амино-5-бром-2'-хлорбензофенон	232, 392	–	–
2-Амино-5,2'-дихлорбензофенон	233, 266, 330, 394	232, 394	394
2-Амино-5-нитробензофенон	230, 350	355	355
2-Амино-5-хлорбензофенон	232, 392	260	–
2,5-Диаминобензофенон	232, 363	232, 357	243, 400
2-Метиламино-5-хлорбензофенон	236, 410	270	–

ИК-спектры бензодиазепинов, допускающие уверенную интерпретацию, могут быть получены при использовании неполярных растворителей типа четыреххлористого углерода. К сожалению, многие соединения этой группы в неполярных растворителях растворяются плохо. Тем не менее ИК-спектры бензодиазепинов в ряде случаев позволяют уверенно идентифицировать эти соединения, особенно в более или менее чистых препаратах и в фармацевтических композициях. Характеристические частоты ИК-спектров некоторых бензодиазепинов приведены в табл. 5.5.

Таблица 5.5. Характеристические частоты (см^{-1}) в ИК-спектрах некоторых 1,4-бензодиазепинов

Наименование соединений	Типы колебаний и связи						
	Валентн. N-H	Валент. C-O	Валент. N \rightarrow O, NO ₂	Деформ. C α p-H	Деформ. C α p-Cl	Деформ. C α p-H	Валент. C α p-Cl
Диазепам	–	1680	–	–	840	740	705
Нитразепам	1710	1685	–	1255	–	745	–
Оксазепам	1706	1687	1578	–	830	–	693
Хлозепид	1700	1625	1590	1260	850	760	690

5.4. Спектральные характеристики каннабиноидов

Данная группа наркотических веществ охватывает более 30 различных соединений, содержащихся в разных частях растений конопли и в наркотических продуктах, приготовляемых из этого растения (гашиш, гашишное масло, смолка и др.). Вследствие этого объектом химико-аналитического исследования редко бывают сколько-нибудь чистые индивидуальные химические соединения этой группы (см. выше, гл. 2). Чаще всего возникает необходимость проводить анализы материалов, включающих многокомпонентные смеси соединений, различающихся по наличию в их структуре различных функциональных групп. В этой ситуации спектральные исследования имеют подчиненное значение. Тем не менее следует отметить, что почти все представители группы каннабиноидов имеют в составе молекул ароматические кольца, обычно с гидроксильным заместителем, что определяет наличие четких максимумов поглощения в их УФ-спектрах. Так, например, спектр спиртового раствора Δ^9 -тетрагидроканнабинола имеет максимум поглощения при 283 нм, а спектр спиртового раствора Δ^9 -тетрагидроканнабинной кислоты имеет максимумы поглощения при 276 и 278 нм.

5.5. Спектральные характеристики кокаина и сопутствующих соединений

Характерные УФ-спектры с выраженными максимумами поглощения имеют кокаин и те его производные, в которых сохраняется бензильная группа (норкокаин, бензоилэкогин, оксикокаин и др.). В кислой среде в спектре кокаина наблюдаются два максимума поглощения при 233 и 275 нм. В ИК-спектрах имеются основные полосы поглощения при 1710, 1275, 1110 и 1037 см^{-1} .

5.6. Спектральный анализ опиатов

Как уже указано в предыдущих разделах этой книги, опиаты – это общее название большой группы природных и синтетических веществ, обладающих морфиноподобными анальгезирующими свойствами и оказывающих определенное влияние на центральную нервную систему и гладкую мускулатуру. Физиологическая активность опиатов оценивается по отношению к морфину, принимаемому за стандартное соединение. Действие опиатов на центральную нервную систему заключается в том, что при приеме внутрь или при внутривенном введении эти препараты вызывают эйфорическое

состояние и чувство облегчения, ощущение решения всех проблем данного субъекта. Однако систематическое применение опиатов ведет к увеличению толерантности, т. е. к ослаблению их действия. Это приводит к необходимости увеличения доз наркотиков, необходимых для достижения желаемого эффекта. В результате у потребителей опиатов возникает физическая и психическая зависимость от этих наркотиков, что характеризуется как наркомания. Среди природных опиатов наибольшее значение имеют морфин, кодеин, тебаин и псевдоморфин. Более сильное физиологическое воздействие проявляют синтетические опиаты – героин (диацетилморфин), дионин (этилморфин), ацетилкодеин.

В составе молекул всех опиатов имеются ароматические циклы, пиридиновые и пиперидиновые структуры, которые обуславливают появление хорошо выраженных полос поглощения в их УФ-спектрах. Некоторые из этих максимумов, характерных для наиболее важных опиатов, приведены в табл. 5.6. В качестве примера на рис. 5.8 приведен УФ-спектр кодеина в диапазоне 190–360 нм, зарегистрированный с помощью хроматографа «Милихром» (рис. 5.8, стр. 72).

Изложенные факты позволяют заключить, что УФ-спектры опиатов дают возможность сделать заключения о присутствии в исследуемой пробе одного или нескольких представителей этой группы веществ, хотя в то же время не всегда позволяют установить природу конкретных соединений.

Таблица 5.6. Максимумы поглощения в УФ-спектрах опиатов, наиболее часто встречающихся в практике контроля наркотических средств

Наименование соединения	Условия регистрации спектров (растворитель, pH среды)	λ_{max} , нм
Морфин	0,1 н HCl, pH = 1	285
	0,1 н NaOH, pH = 13	205
		298
Кодеин	Этанол	286
	0,1 н HCl, pH = 1	211
		285
	0,1 н NaOH, pH = 13	284
	Вода, pH = 7	284
Кодеина фосфат	0,1 н HCl, pH = 1	284
	0,1 н NaOH, pH = 13	284
	Этанол	281
Тебаин	0,1 н HCl, pH = 1	278
	0,1 н H ₂ SO ₄ , pH = 1	279
	0,1 н NaOH, pH = 13	278

Несколько более информативны ИК-спектры опиатов, обычно снимаемые в твердом состоянии исследуемых веществ, в форме таблеток с KBr (1 мг исследуемого вещества на 250 мг бромида калия). В табл. 5.7 представлены частоты основных полос поглощения в спектрах наиболее важных представителей этой группы веществ. Легко видеть, что эти частоты существенно различаются между собой и потому позволяют определить наличие в исследуемой пробе по крайней мере двух-трех опиатов.

Довольно информативными оказываются и масс-спектры опиатов. При ионизации электронным ударом с энергией электронов 70 эВ в их масс-спектрах наблюдаются достаточно интенсивные сигналы молекулярных ионов с величиной m/z (отношение

массы иона к его заряду) 285 для морфина, 299 для кодеина, 341 для героина и 311 для тебаина. Подробнее вопрос о применении метода масс-спектрометрии для определения опиатов рассмотрен в гл. 9, где описано совместное применение масс-спектрометрии и хроматографических методов, что даёт начало новому методу хромато-масс-спектрометрии, который в настоящее время является самым мощным инструментом химико-аналитического исследования органических веществ.

Таблица 5.7. Характеристические частоты наиболее интенсивных полос поглощения в ИК-спектрах наиболее важных представителей группы опиатов

Наименование соединений	Частоты полос поглощения, см^{-1}
Морфин	1243, 1118, 1086, 945, 833, 805
Кодеин	1500, 1268, 1111, 1052, 934, 793
Тебаин	1605, 1270, 1234, 1144, 1030, 910
Героин	1764, 1736, 1245, 1215, 1178, 911

5.7. Спектральные характеристики фенилалкиламинов

Группа фенилалкиламинов включает большое число соединений, обладающих достаточно разнообразной биологической активностью. Многие вещества этой группы являются стимуляторами центральной нервной системы и проявляют симпатомиметическую активность. Так, например, эфедрин, алкалоид природного происхождения, является α и β -адреностимулятором, вызывает сужение кровеносных сосудов и повышает артериальное давление. Другие фенилалкиламины применяются в медицине в качестве лекарственных средств.

Продукт химической трансформации эфедрина, кетон эфедрон, нелегально применяется в качестве наркотика, а синтетические фенилалкиламины (амфетамин, метам-

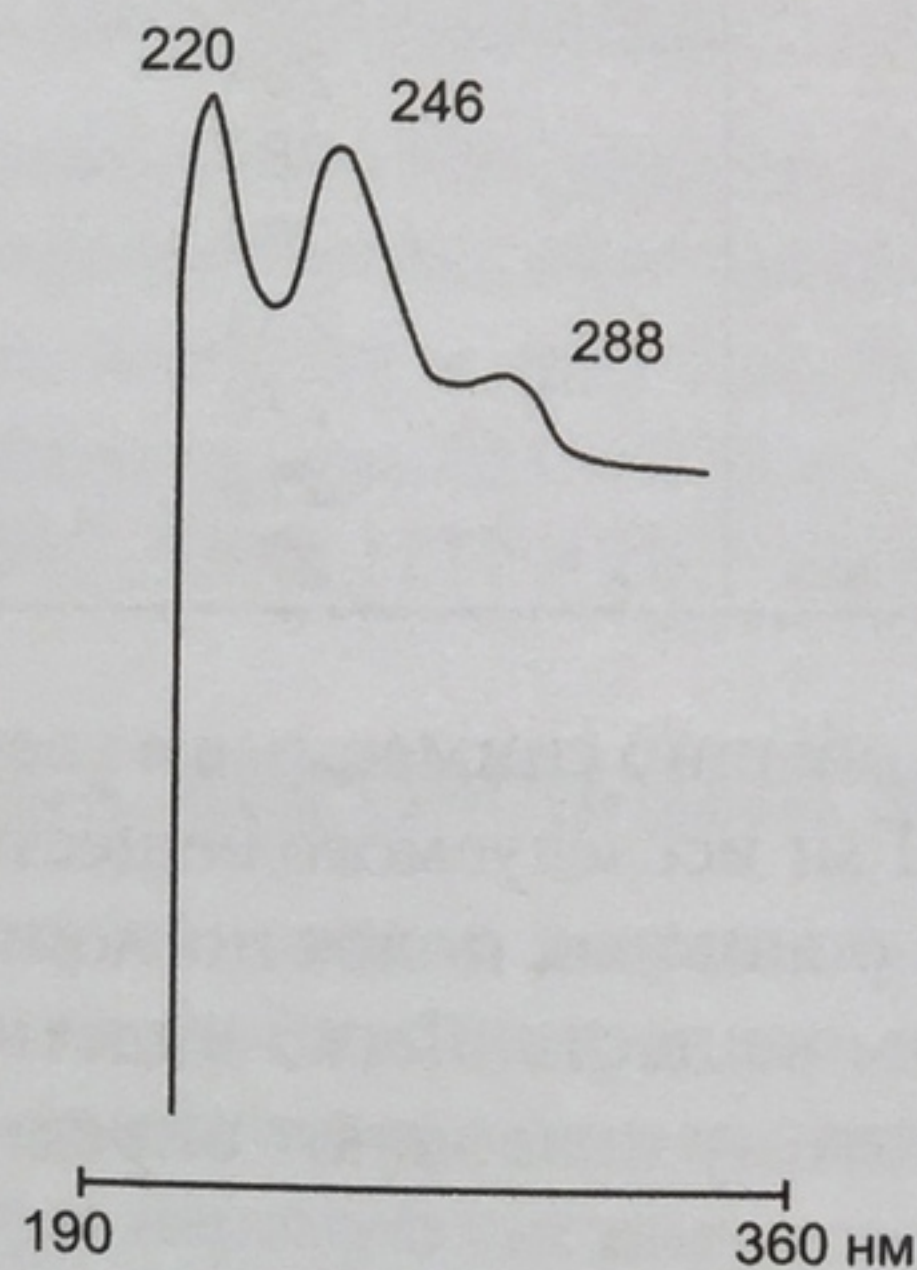


Рис. 5.8. УФ-спектр кодеина в диапазоне длин волн 190-360 нм в растворе ацетонитрила. Время регистрации 0.8 с.

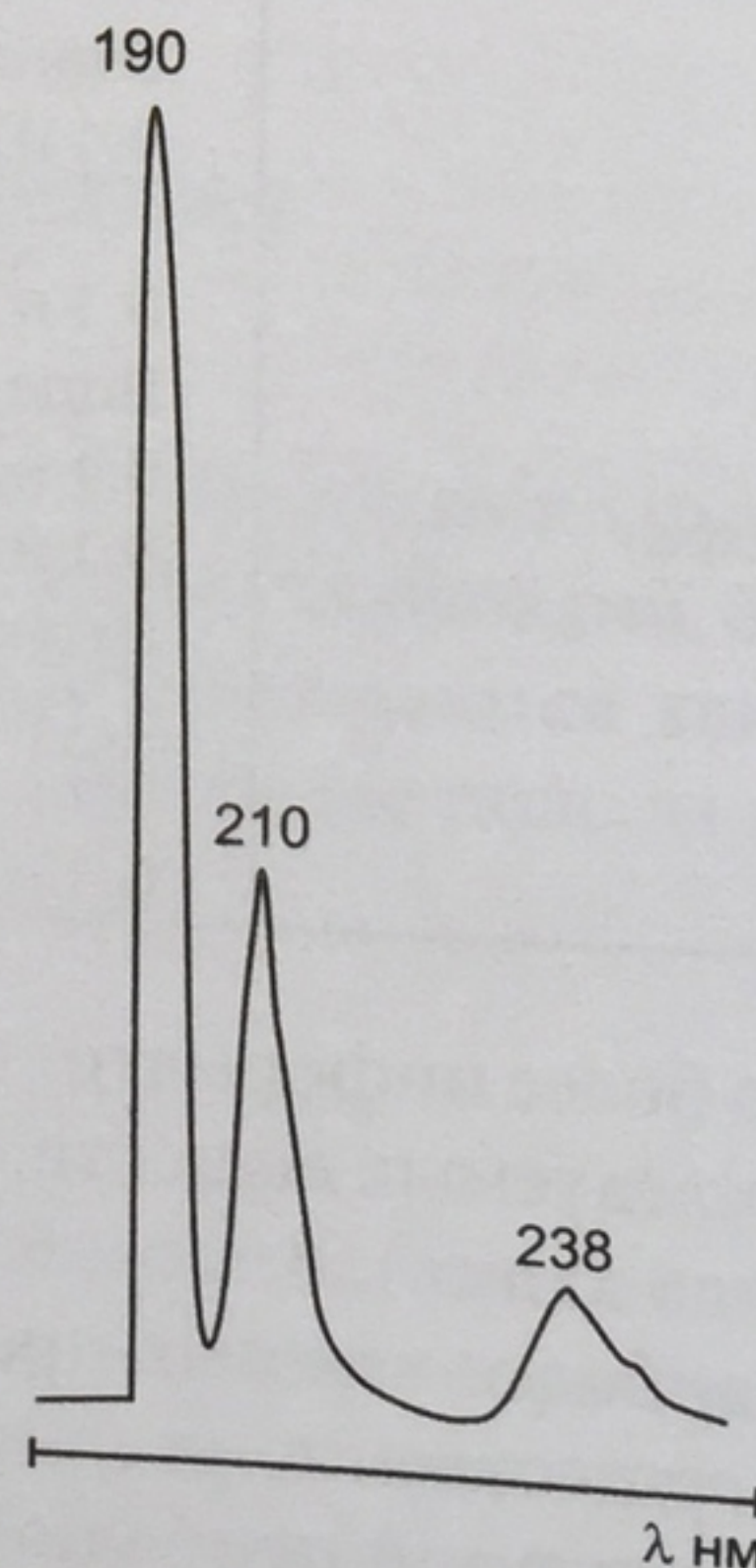


Рис. 5.9. УФ-спектр норэфедрина в диапазоне длин волн 190-360 нм в растворе ортофосфорной кислоты (0.2 М) с добавкой метанола и диэтиламина (75:20:1). Время регистрации 1 с.

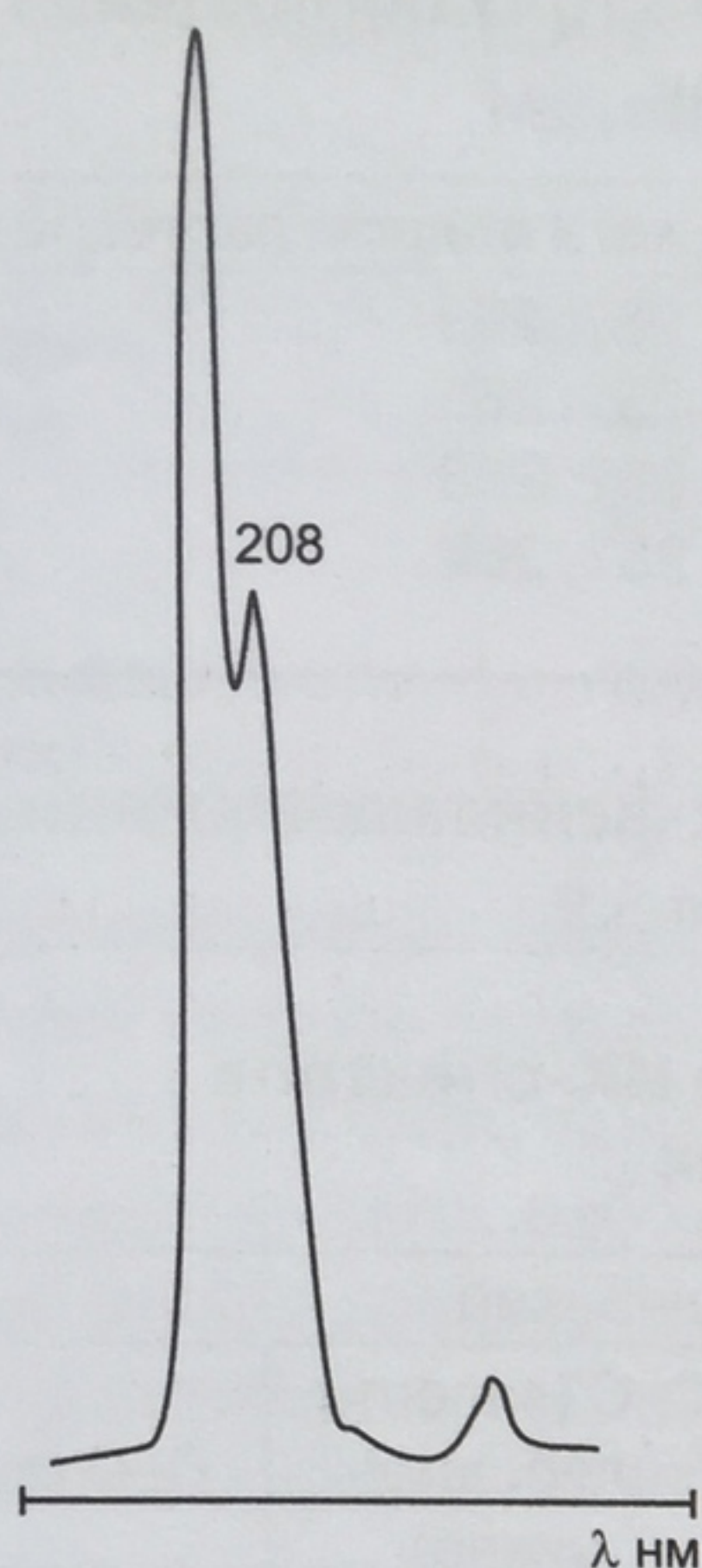


Рис. 5.10. УФ-спектр эфедрина в диапазоне длин волн 190–360 нм в растворе ортофосфорной кислоты (0.2 М) с добавкой метанола и диэтиламина (75:20:1). Время регистрации 1 с.

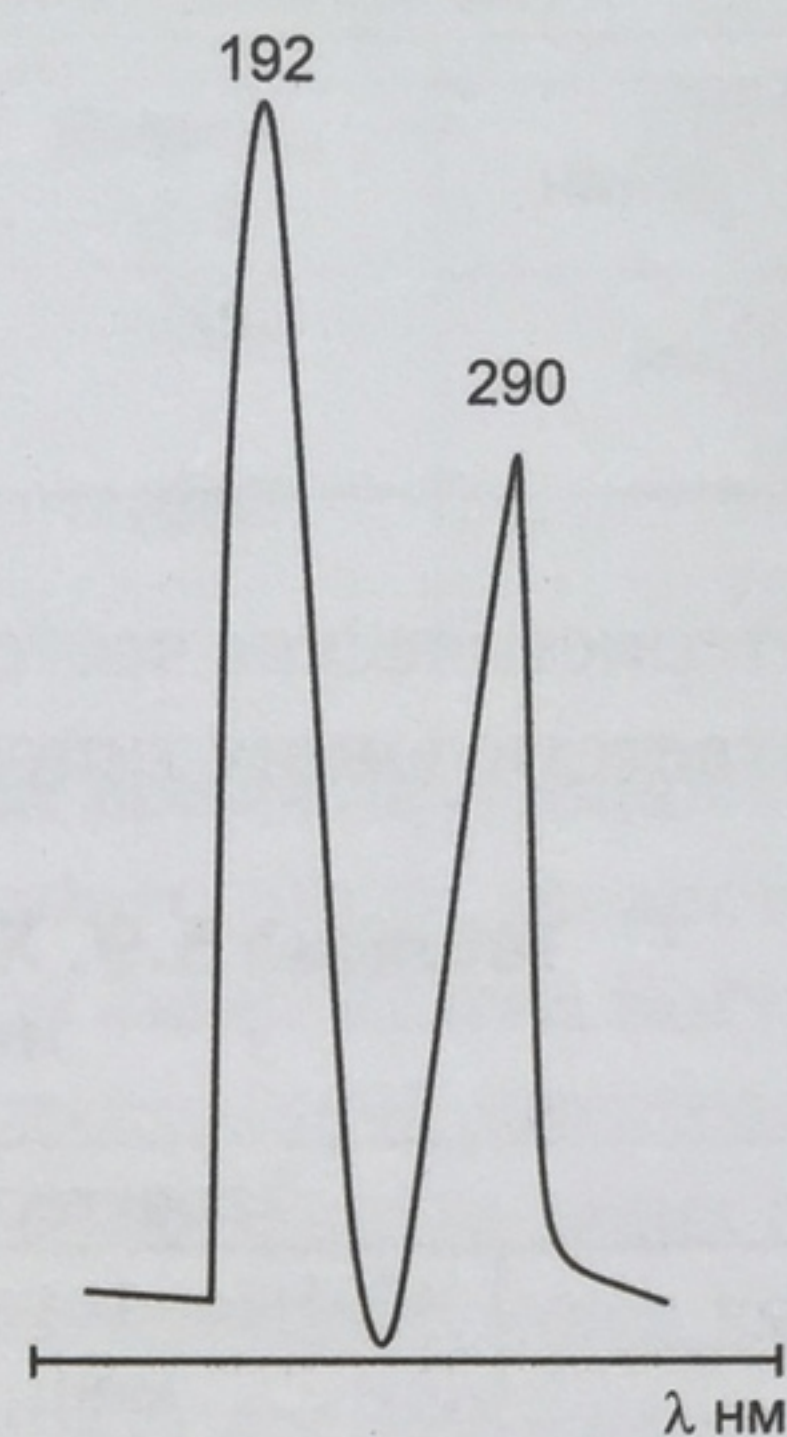


Рис. 5.11. УФ-спектр эфедрона в диапазоне длин волн 190–360 нм в растворе ортофосфорной кислоты с добавкой метанола и диэтиламина (75:20:1). Время регистрации 1 с.

фетамин и др.) являются запрещенными для использования в спорте допинговыми средствами и психомоторными стимуляторами.

В молекулах всех этих соединений имеется ароматическая фенильная группа и аминный атом азота, что определяет значительную схожесть их УФ-и ИК-спектров. Основные спектральные характеристики важнейших фенилалкиламинов приведены в табл. 5.8, а на рис. 5.9–5.11 представлены примеры УФ-спектров некоторых представителей этой группы веществ, зарегистрированные с помощью УФ-детектора жидкостного хроматографа «Милихром». Значительные различия в коэффициентах молярного поглощения эфедрона и других соединений этой группы при 250 нм позволяют провести селективное определение эфедрона в присутствии других родственных компонентов (норэфедрина, эфедрина, амфетамина, метамфетамина и др.). При этом определение проводится путем регистрации при двух длинах волн: 210 нм для всех определяемых фенилалкиламинов и 250 нм для селективно определяемого эфедрона с последующим сопоставлением полученных спектров для количественного определения эфедрона в биопробах.

Наиболее интенсивен в УФ-спектрах фенилалкиламинов максимум поглощения при $\lambda_{\text{max}} = 257$ нм (табл. 5.8).

Таблица 5.8. Характерные максимумы в УФ-спектрах поглощения некоторых фенилалкиламинов

Наименование соединения	λ_{max} , нм в водном растворе с pH = 1
Амфетамин	251, 257, 263
Метамфетамин	251, 257, 263
Эфедрин	251, 257, 263
Норэфедрин	251, 257, 262
Эфедрон	251 – -

Характеристические частоты в ИК-спектрах некоторых фенилалкиламинов с указанием соответствующих типов колебаний приведены в табл 5.9.

Таблица 5.9. Характеристические частоты ИК-спектров некоторых фенилалкиламинов

Характеристические частоты, см ⁻¹ , и тип колебаний				
Наименование соединения	=C–H (деформ. колеб. монозамещ. бензола; C–H алкилн. радикала)	C–O (валентн.)	C=C (валентн. колеб. аром. цикла)	C–O (валентн.)
Амфетамин	700, 740, 825, 1090	–	1495 –	1605–
Метамфетамин	698, 747, 1060, 1085	–	1491 –	1590 –
Эфедрин	699, 754, 760, 994	1049, 1242	1400, 1480	1605–
Норэфедрин	700, 746, 1030, 1055	–1201	1500 –	1590–
Эфедрон	702, 757 – -	–	1510 –	1590, 1695

5.8. Спектральные характеристики производных фенотиазина

Наиболее часто в химико-аналитической практике приходится встречаться с необходимостью определения аминазина, дипразина, левомепромазина и тиоридазина. Благодаря наличию в молекулах этих веществ сопряженной трициклической ароматической системы растворы этих соединений интенсивно поглощают УФ-излучение при 250–255 и 320 нм. Изменение характера заместителей и их положения приводит к сдвигу соответствующих максимумов в пределах 3–5 нм.

Наиболее важные метаболиты производных фенотиазина, например, легко образующиеся продукты окисления по атому серы – сульфоксиды и сульфоны – имеют более сложные и более индивидуальные УФ-спектры. Так, в спектре сульфоксида хлорпромазина наблюдаются 4 максимума при 239, 274, 300 и 341 нм.

Довольно характеристичны ИК-спектры производных фенотиазина, данные о которых приведены в табл. 5.10.

Таблица 5.10. Характеристические частоты (см⁻¹) ИК-спектров некоторых фенотиазинов

Наименование соединения	Типы колебаний и связи				
	Деформ. N-H	Валентн. C-N	Валентн. C-S	Деформ. C-S	Деформ. C-H
Аминазин	1561	1240	1220	1095	747
Дипразин	–	1259, 1287	1229	–	758
Левомепромазин	1580	1270	1205	1030	752
Тиоридазин	–	1248, 1281	1234	–	754

В заключение этой главы следует указать, что в настоящее время опубликованы многочисленные сводки данных об УФ- и ИК-спектрах большого числа лекарственных, наркотических и допинговых веществ. Кроме уже указанной выше статьи Богуша и со-тр. [12], можно указать работы [15–21], в которых заинтересованный читатель найдет обширные сводки данных по УФ- и ИК-спектроскопии широкого круга таких веществ. В табл. 5.11 приведена небольшая часть данных о длинах волн максимумов в УФ-спектрах поглощения, взятая из работы [12], где охарактеризованы более 380 лекарственных, токсических и наркотических веществ. УФ-спектры некоторых из них приведены на рис. 5.12, в котором отражена малая часть спектров из их обширной сводки, приведенной в работе [12] (более 175 соединений). Все эти данные показывают широкие возможности УФ-и ИК-спектроскопии в выявлении наличия наркотических веществ в самых разнообразных объектах.

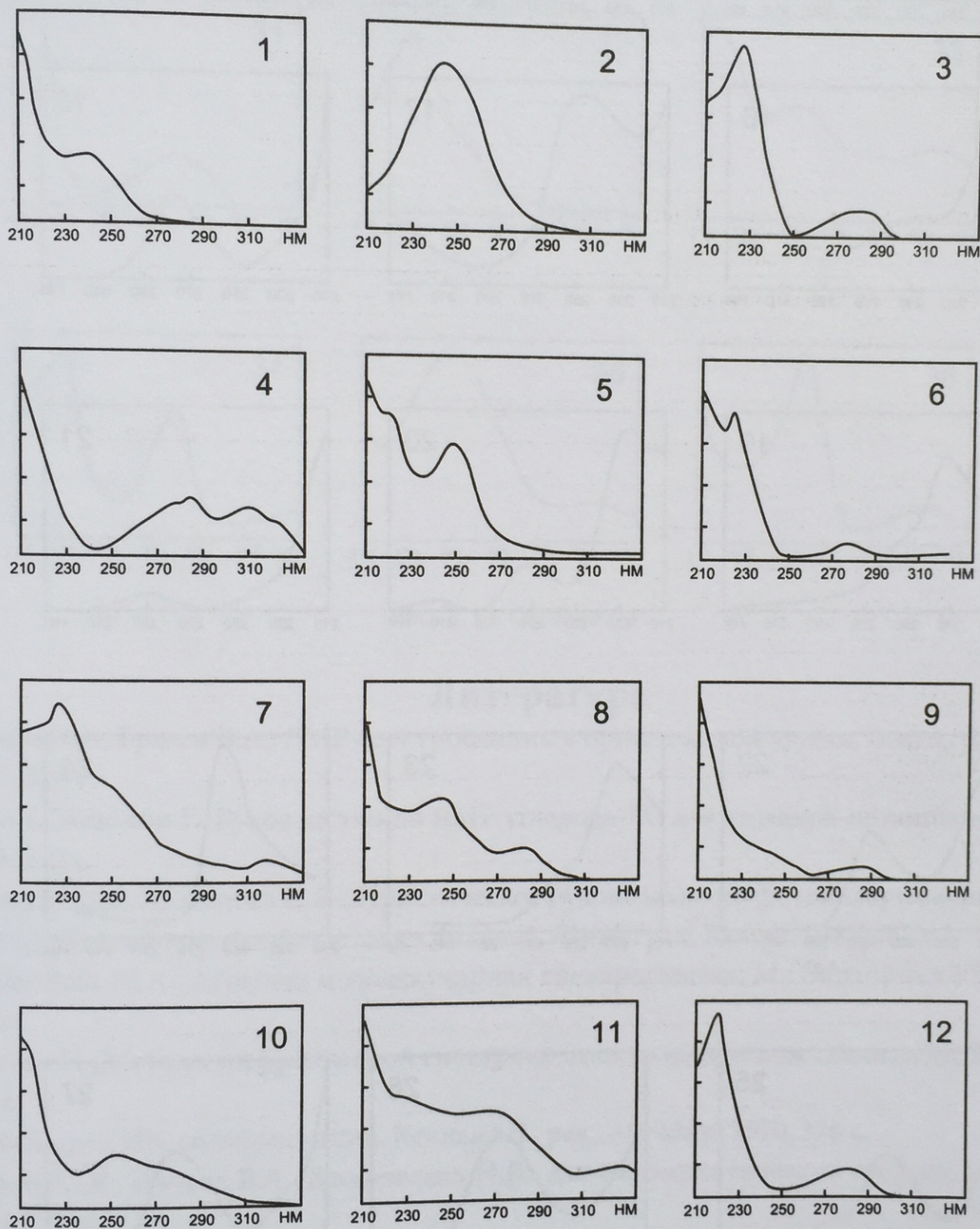
Таблица 5.11. Длины волн максимумов в УФ-спектрах поглощения некоторых лекарственных и наркотических веществ и продуктов их деградации [12]

Наименование веществ	λ_{\max} , нм
Аллобарбитал	251
Амфетамин	257
Атенолол	275
2-Амино-5-хлорбензофенон (продукт гидролиза хлордiazепоксиды, хлоразепама, демоксипана, нордiazепама, оксазепама и оксазолама)	236
2-Амино-2',5- дихлорбензофенон (продукт гидролиза лоразепама)	233
2-Амино-5-нитробензофенон (продукт гидролиза нитразепама)	356
2-Амино-2'-хлор-5-нитробензофенон (продукт гидролиза клоназепама)	356
2-Амино-2'-фтор-5-нитробензофенон (продукт гидролиза норфлунизепам)	357
7-Аминофлунизепам	236
Варфарин	273
Галоперидол	245
Гидрокодон	282
2',5-Дихлор-2-(метиламино)-бензофенон (продукт гидролиза лорметазепама)	265
Демоксепан	308
Диаморфин	276
Диазепам	229
Дигидрокодеин	281

2-[2-(Диэтиламино)-этиламино]-5-хлоро-2'-фторобензофенон (продукт гидролиза флуразепама)	236
Дроперидол	278
Иохимбин	273
Кетамин	270
Клоназепам	309
Клотиазепам	243
Кокаин	275
Кодеин	284
Леворфанол	281
Лоразепам	230
LSD (диэтиламид лизергиновой кислоты, ЛСД)	315
3,4-Метилendioксиамфетамин	285
3,4-Метилendioксиэтиламфетамин	285
3,4-Метилendioксиметиламфетамин	275
Медазепам	254
Мескалин	269
Метаквалон	266
6-Моноацетилморфин	283
Морфин	285
Никотинамид	261
Никотин	260
Нитразепам	311
Носкапин	312
Норфлуниразепам	312
Оксазепам	228
3-Оксифлуниразепам	311
Папаверин	249
Стрихнин	254
Δ^9 -Тетрагидроканнабинол	279
Тебаин	285
Теобромин	272
Теофиллин	270
Тиопентал	285
Трамадол	270
Флуниразепам	309
Флуфеназин	307
Флуразепам	309
Фуросемид	275
Этилморфин	282

Рис. 5.12
2 - аскор
7 - диазе
13 - кето
19 - лор
25 - стри
31 - трип
36 - хлор

Рис. 5.12. УФ- спектры некоторых лекарственных и наркотических веществ: 1 – амитриптилин; 2 – аскорбиновая кислота; 3 – атенолол; 4 – варфарин; 5 – галоперидол ; 6 – диаморфин; 7 – диазепам; 8 – дроперидол; 9 – морфин; 10 – дезипрамин; 11 – индометацин; 12 – иохимбин; 13 – кетотифен; 14 – клобазам; 15 – кокаин; 16 – клоназепам; 17 – колхицин; 18 – кофеин; 19 – лоразепам; 20 – метаквалон; 21 – морфин; 22 – никотинамид; 23 – оксазепам; 24 – папаверин; 25 – стрихнин; 26 – теобромин; 27 – теофиллин; 28 – тетразепам; 29 – трамадол; 30 – дезипрамин; 31 – триптамин; 32 – флуразепам; 33 – флунитразепам; 34 – фуросемид ; 35 – хлордиазепоксид; 36 – хлорпромазин.



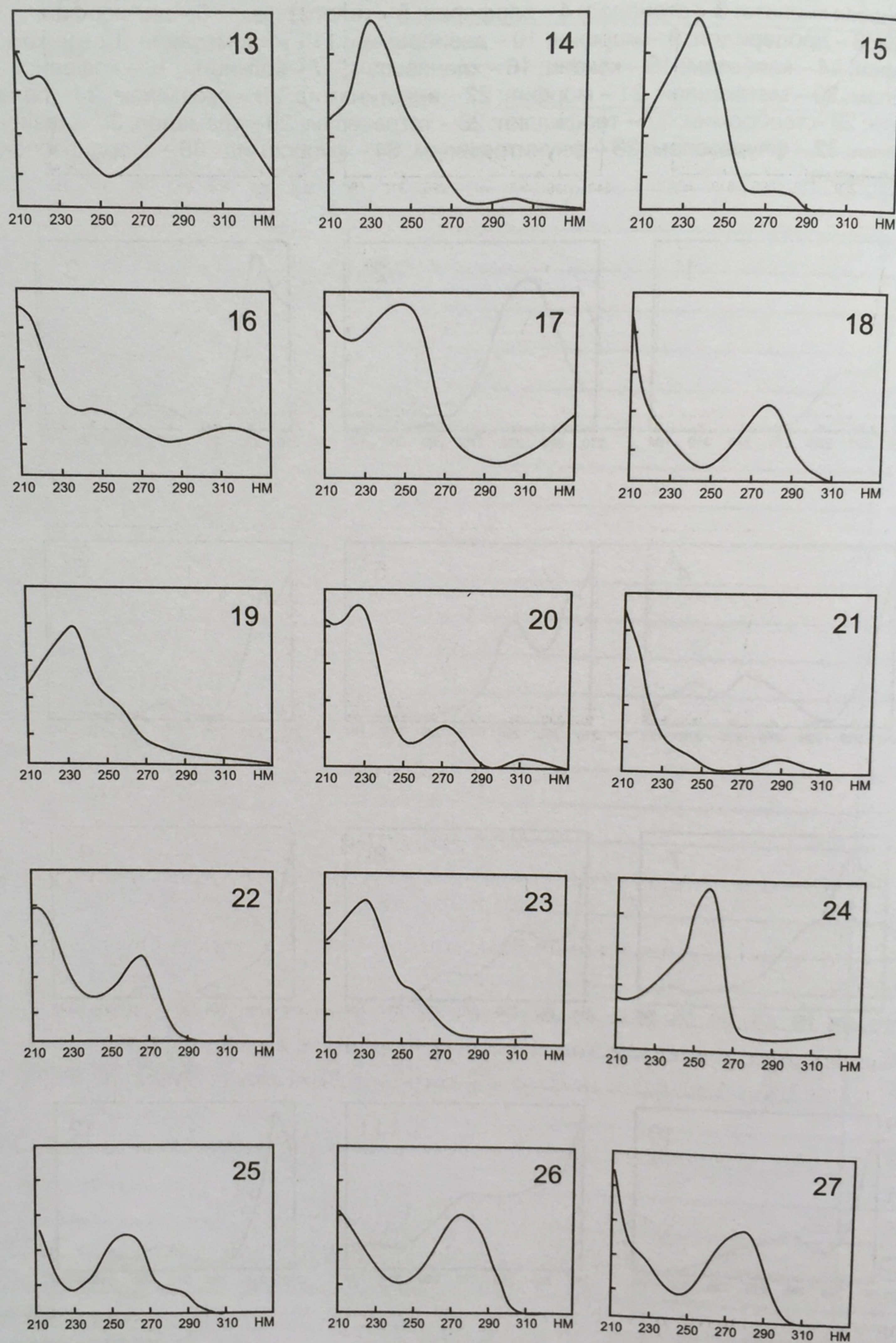


Рис. 5.12. Продолжение

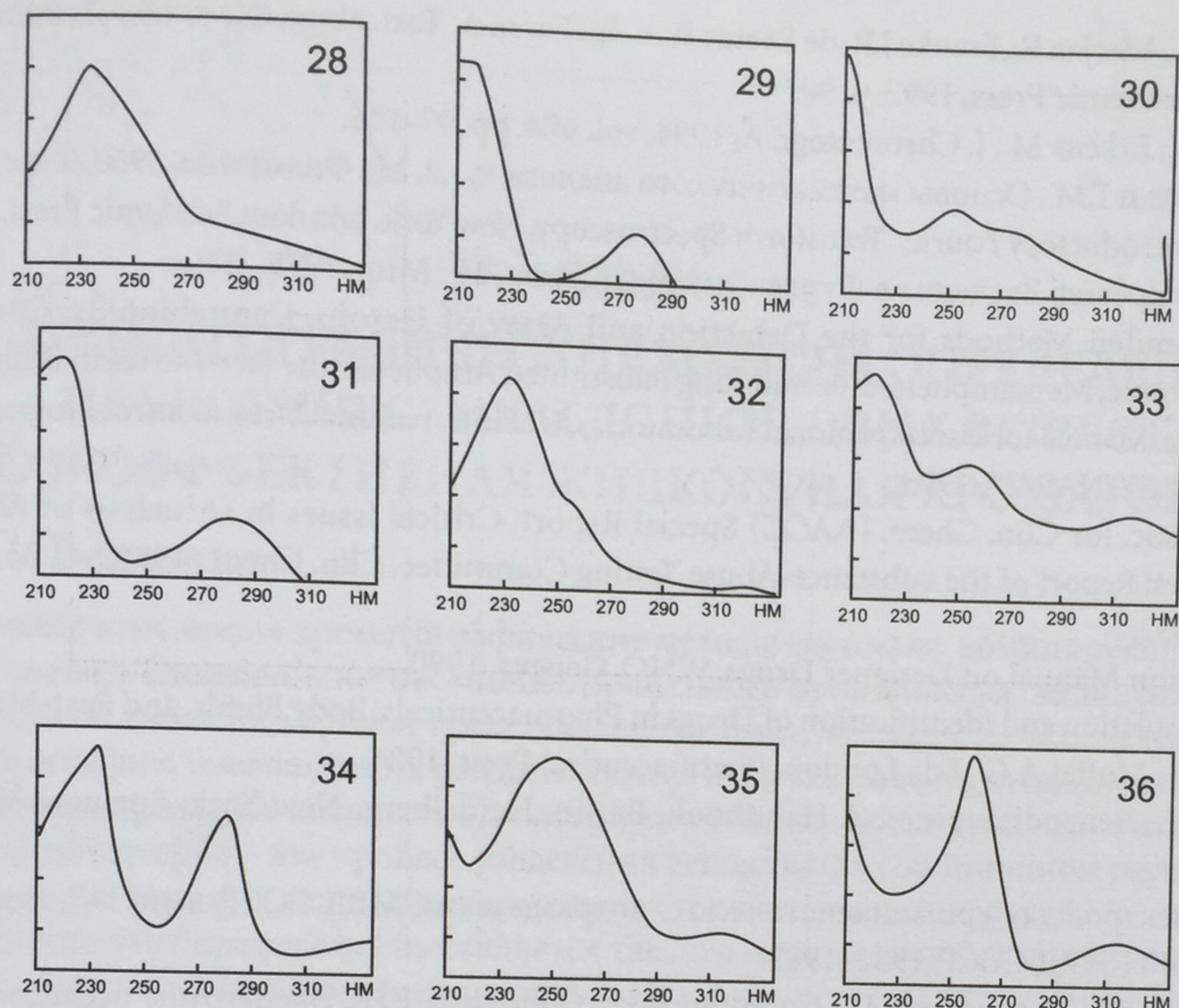


Рис. 5.12. Окончание

Литература

1. Ионин Б.А., Ершов Б.А., ЯМР спектроскопия в органической химии, Ленинград: Химия, 1967, 326 с.
2. Леви Г., Нельсон Г., Руководство по ЯМР углерода- ^{13}C для химиков-органиков, М.: Мир, 1975, 295 с.
3. Булатов М.И., Калинин И.П., Практическое руководство по фотоколориметрическим и спектрофотометрическим методам анализа, Ленинград: Химия, 1968, 382 с.
4. Ельяшевич М.А., Атомная и молекулярная спектроскопия, М.: Эдиториал УРСС, 2001, 894 с.
5. Кесслер И., Методы инфракрасной спектроскопии в химическом анализе, М.: Мир, 1864, 287 с.
6. Прикладная ИК-спектроскопия, Кендалл Л., ред., М.: Мир, 1970, 376 с.
7. Еремин С.К., Изотов Б.А., Веселовская Н.В., Анализ наркотических средств, М.: Мысль, 1993, 271 с.
8. Симонов Е.А., Изотов Б.Н., Фесенко А.В., Наркотики. Методы анализа на коже, ее при- датках и выделениях, М.: Анахарсис, 2000, 128 с.
9. Веселовская Н.В., Коваленко А.Е., Папазов И.П. и др., Наркотики. Свойства, действие, фармакокинетика, метаболизм, М.: Изд. дом «Нарконет», 2002, 228 с.
10. Koves E.M., Wells J., J. Forensic Sci., 1992, vol. 37, p. 42.

11. Bogusz M., Aderjan R., Franke J.P., de Zeeuw R.A., In: Forensic Toxicology, Oliver J.S., Tl., Edinburg: Scottish Academic Press, 1992, p. 90.
12. Bogusz M., Erkens M., J. Chromatogr. A, 1994, vol. 674, pp. 97-126.
13. Фихтенгольц Г.М., Основы математического анализа, т.1,2, М., Физматгиз, 1960, 904 с.
14. Ball R.J., Introductory Fourier Transform Spectroscopy, New York, London: Academic Press, 1972; русский перевод: Введение в Фурье-спектроскопию, М.: Мир, 1975, 380 с.
15. Recommended Methods for the Detection and Assay of Heroin, Cannabinoids, Cocaine, Amphetamine, Methamphetamine and Ring Substituted Amphetamine Derivatives in Biological Specimens. Manual for Use by National Laboratories, UN International Drug Control Programme, New York: SY/NAR/27, 1995.
16. Amer. Assoc. for Clin. Chem. (AACC) Special Report. Critical Issues in Urinalysis of Abused Substances: Report of the Substance-Abuse Testing Committee, Clin. Chem., 1988, vol. 34, no.3, pp. 605-632.
17. Information Manual on Designer Drugs, WHO, Geneva, 1990.
18. Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids, and Post-Mortem Materials. Moffat A.C., Ed., London: Pharmaceutical Press, 1986.
19. Schütz H., Benzodiazepines: A Handbook, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1982.
20. Атлас спектров для криминалистических подразделений МВД СССР, вып. 1-7, Новосибирск: ЭКЦ МВД СССР, 1982-1989.
21. Агинский В.Н., Савилов А.П., Сорокин В.И., Сорокина Г.И., Экспертное исследование веществ органической природы на принадлежность к наиболее распространенным синтетическим наркотическим и сильнодействующим средствам. Методические рекомендации, ЭКЦ МВД России, 1995, 52 с.

ГЛАВА 6

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАРКОТИЧЕСКИХ И ДОПИНГОВЫХ ВЕЩЕСТВ. ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

6.1. Введение

В настоящее время хроматографические методы занимают доминирующее положение в анализе сложных многокомпонентных смесей органических соединений.

Достоинство этих методов представляет тот факт, что все они используют процесс хроматографии, позволяющий разделить смесь веществ на составляющие ее компоненты и затем определить количество, а часто и химическую природу каждого из них [1, 2].

Хроматография – это процесс разделения веществ при сорбционном распределении их в системе двух фаз, одна из которых движется относительно другой.

Обычно этот процесс осуществляется так, что одна из этих фаз является неподвижной, а вторая движется относительно нее. Эта фаза, естественно, называется подвижной.

Неподвижной фазой может быть твердое тело, способное к адсорбции разделяемых веществ, то есть их связывания на своей поверхности, или жидкость, которая может поглощать эти вещества путем растворения. Этот процесс называют абсорбцией.

Подвижной фазой могут также служить жидкости, газы и вещества в особом состоянии, находящиеся при давлении и температуре, немного превышающими их критические параметры – сверхкритические флюиды [3–6]. Соответственно, различают жидкостную, газовую и сверхкритическую флюидную хроматографию. Обычно процесс хроматографии осуществляют в колонке – трубке, заполненной подходящим сорбентом, через которую протекает подвижная фаза. В качестве сорбента может выступать жидкость, полимерное вещество или тонкий слой адсорбента, покрывающий изнутри стенки тонкой трубки – капилляра [7–9].

Подлежащую разделению смесь веществ вводят в форме дискретной возможно более короткой зоны в начало колонки. Под действием потока подвижной фазы каждый компонент смеси начинает продвигаться вдоль колонки с присущей ему скоростью, которая зависит от того, какая часть его общего количества находится в подвижной фазе. Соотношение концентраций компонента разделяемой смеси в неподвижной и подвижной фазе принято называть коэффициентом распределения. Эта величина определяется свойствами этого компонента, а также свойствами неподвижной и подвижной фаз хроматографической системы, температурой колонки и давлением в ней.

Разделенные в колонке компоненты поочередно достигают конца колонки, где установлено устройство, фиксирующее их появление в потоке подвижной фазы – детек-

тор. Время пребывания компонента разделяемой смеси в колонке называется временем удерживания. В некоторых вариантах хроматографии процесс ведут в течение времени, меньшего, чем время удерживания первого компонента смеси, продвигающегося по колонке с наибольшей скоростью. В этом случае полностью или частично разделенные вещества остаются в колонке в форме более или менее резко отграниченных зон – хроматографических полос, форма и положение которых могут быть выявлены различными способами.

Оба описанных случая относятся к так называемой элюентной хроматографии, имеющей наиболее важное значение для проблем определения контролируемых веществ, рассматриваемых в этой книге. Кроме этого, существуют еще фронтальная хроматография, когда в колонку непрерывно подается подлежащая разделению смесь, и вытеснительная хроматография, в которой разделение веществ основано на том, что более энергично сорбирующийся компонент вытесняет менее энергично сорбирующийся с поверхности применяемого адсорбента. Эти варианты хроматографии в данной книге рассматриваться не будут. Сведения об этих методах можно найти в монографиях [10, 11].

В наиболее обычных вариантах элюентной хроматографии концентрация какого-либо конкретного компонента в подвижной фазе, покидающей колонку, вначале равна нулю. Когда зона этого компонента покидает колонку, его концентрация в подвижной фазе быстро возрастает, достигает максимума и потом вновь падает до нуля. Таким образом, детектор на выходе колонки регистрирует серию возрастающих и затем убывающих сигналов – хроматографических пиков, в совокупности составляющих дифференциальную хроматограмму (рис. 6.1).

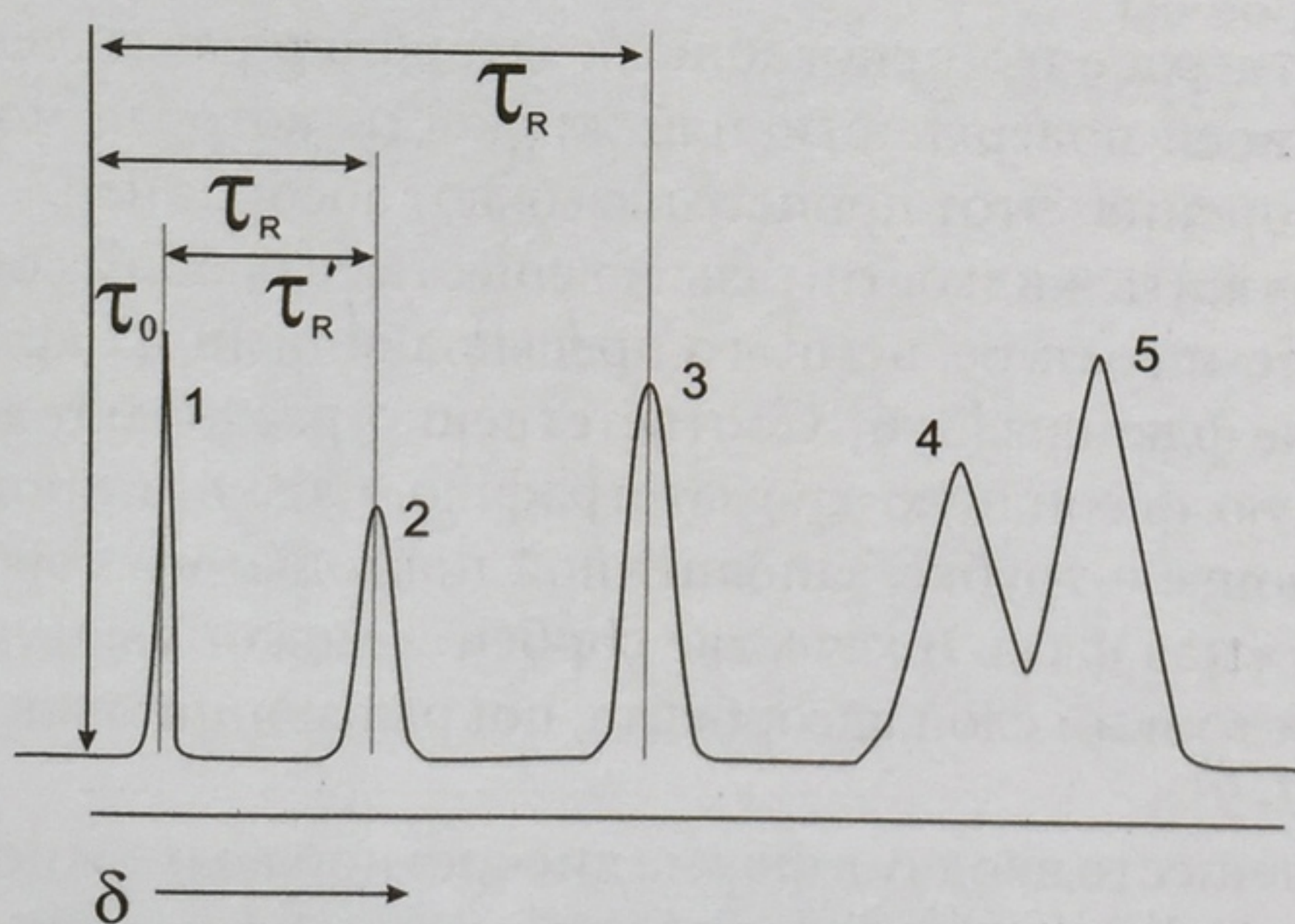


Рис. 6.1. Дифференциальная хроматограмма

Время, прошедшее с момента ввода пробы до выхода из колонки компонента, не сорбирующегося неподвижной фазой, совпадает со временем, за которое колонку проходит поток подвижной фазы. Это время часто называют «мертвым временем системы», τ_0 . Для всех прочих компонентов это время называют «полным временем удерживания» τ_R . Разница этих двух величин называется «исправленным временем удерживания», τ'_R

$$\tau'_R = \tau_R - \tau_0 \quad (6.1)$$

Именно эта величина характеризует интенсивность сорбционного взаимодействия данного компонента с неподвижной фазой применяемой хроматографической системы. Пики на хроматограмме могут быть отделены друг от друга полностью (как пики 1–4 на рис. 6.1) или частично (как пики 4–5 там же).

При постоянной скорости подвижной фазы ее объем, покидающий колонку от момента ввода пробы до момента выхода из колонки максимума пика компонента i , называется «объемом удерживания», V_i . При данных условиях эксперимента эта величина не зависит от скорости подвижной фазы:

$$V_i = \omega \cdot \tau_R \quad (6.2)$$

где ω – объемная скорость подвижной фазы.

6.2. Степень разделения пиков, коэффициент разделения, число теоретических тарелок

В практике хроматографии нередки случаи, когда пики отдельных компонентов разделяются неполностью (рис. 6.2б). В этом случае качество разделения можно охарактеризовать отношением расстояния между максимумами пиков к их средней ширине, измеренной на уровне базовой (нулевой линии):

$$R_s = \frac{2(V_{R_2} - V_{R_1})}{a_1 + a_2} \quad (6.3)$$

Это отношение называется степенью разделения *.

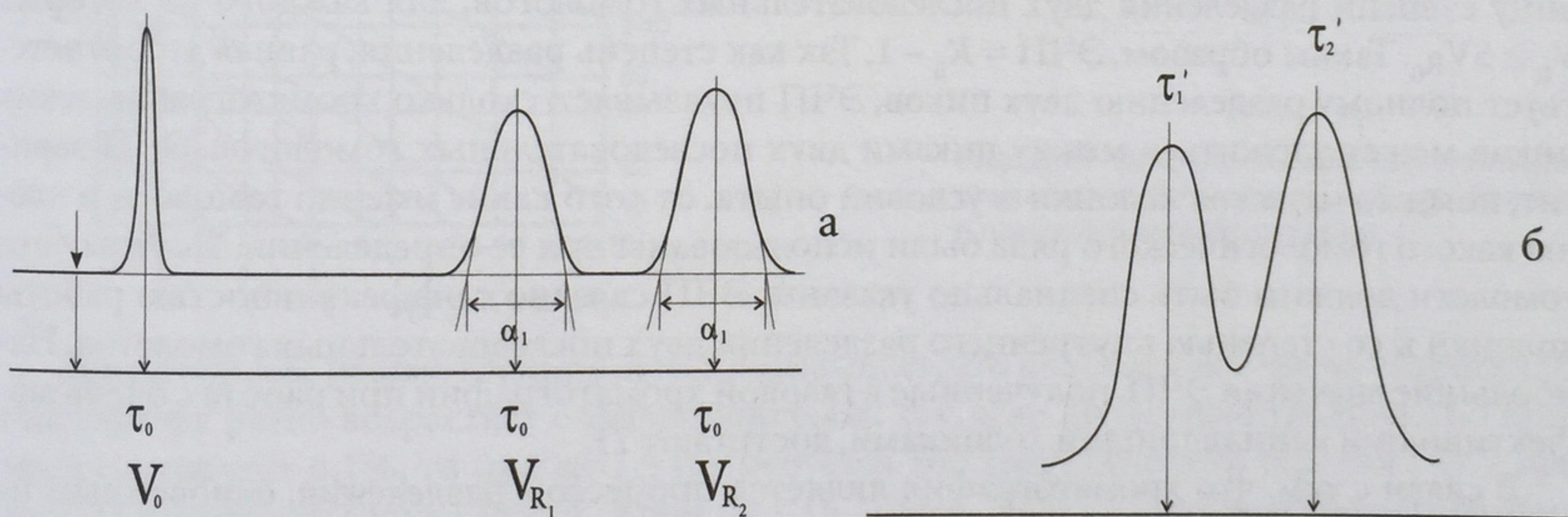


Рис. 6.2. К расчету степени разделения: а – параметры хроматограммы; б – неполностью разделенные пики

Для анализа в большинстве случаев оказывается достаточной степень разделения, равная 0,5–0,7. Степень разделения, равная 1, соответствует полному разделению пиков. При дальнейшем увеличении R_s между пиками появляется участок нулевой линии. Разделение веществ с препаративными целями требует более высокой степени разделения. При прочих равных условиях степень разделения будет тем больше, чем больше различие в параметрах удерживания компонентов. Отношение их объемов удерживания

* В отечественной литературе степень разделения часто называют критерием разделения.

$$\alpha = \frac{V_{R_2}}{V_{R_1}} \text{ при } (V_{R_2} > V_{R_1}) \quad (6.4)$$

называется коэффициентом разделения.

Степень разделения связана, с одной стороны, с характером взаимодействия разделяемых веществ с неподвижной фазой, которая определяет величину объемов удерживания. С другой стороны, степень разделения зависит от качества применяемой колонки и может меняться в зависимости от конкретных условий эксперимента.

Охарактеризовать независящие от качества колонки возможности разделения пары веществ при данном сочетании неподвижной и подвижной фаз можно с помощью так называемой степени внутреннего разделения, равной отношению разницы объемов удерживания двух веществ к их средней величине:

$$R_{in} = \frac{2(V_{R_2} - V_{R_1})}{V_{R_2} + V_{R_1}} \quad (6.5)$$

Из формулы (6.5) видно, что R_{in} изменяется от 0 до 2. Если разделить числитель и знаменатель на V_{R_1} , то можно с учетом формулы (6.4) выразить R_{in} через α :

$$R_{in} = 2 \frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \quad (6.6)$$

Полезным для практической оценки разделяющей способности той или иной хроматографической колонки является предложенное Харрелом и Перри [27] эффективное число пиков (ЭЧП), или число разделения, которое равно уменьшенной на единицу степени разделения двух последовательных гомологов, для каждого из которых $V_R \geq 5V_{R_0}$. Таким образом, $\text{ЭЧП} = R_h - 1$. Так как степень разделения, равная 1, соответствует полному разделению двух пиков, ЭЧП показывает, сколько хроматографических пиков может уложиться между пиками двух последовательных гомологов. ЭЧП зависит, помимо качества колонки и условий опыта, от того какие именно гомологи и члены какого гомологического ряда были использованы при ее определении. Поэтому эти гомологи должны быть специально указаны. ЭЧП связано с эффективностью работы колонки и со степенью внутреннего разделения двух последовательных гомологов. Наибольшие значения ЭЧП, полученные в газовой хроматографии при работе с очень эффективными капиллярными колонками, достигают 71.

В связи с тем, что хроматография является процессом разделения, основанным на различиях в скорости перехода отдельных компонентов через границу раздела подвижной и неподвижной фаз (т.е. актов сорбции и десорбции), разделяющая способность колонки должна быть тем выше, чем больше таких элементарных актов совершит каждая молекула разделяемых веществ за время своего пребывания в колонке. По аналогии с процессом ректификации, где разделение компонентов достигается в результате многократных контактов парообразной и жидкой фаз на специальных аппаратных элементах, называемых «тарелками», число таких переходов считают мерой эффективности колонки и называют его числом теоретических тарелок (ЧТТ). Длину колонки, приходящуюся на одну теоретическую тарелку, называют высотой, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ). Число теоретических тарелок, необходимое для достижения заданной степени разделения, определяется формулой:

$$n = \left(4R_s \frac{\alpha + 1}{\alpha - 1} \right)^2 = \left(\frac{4R_s}{R_{in}} \right)^2 \quad (6.7)$$

откуда

$$R_s = R_{in} \cdot \sqrt{n} / 4 \quad (6.8)$$

На основе этих уравнений была построена номограмма, позволяющая определить число теоретических тарелок колонки, необходимое для получения компонентов с заданной степенью чистоты, если известны состав исходной смеси и коэффициент разделения компонентов α (рис. 6.3) [12].

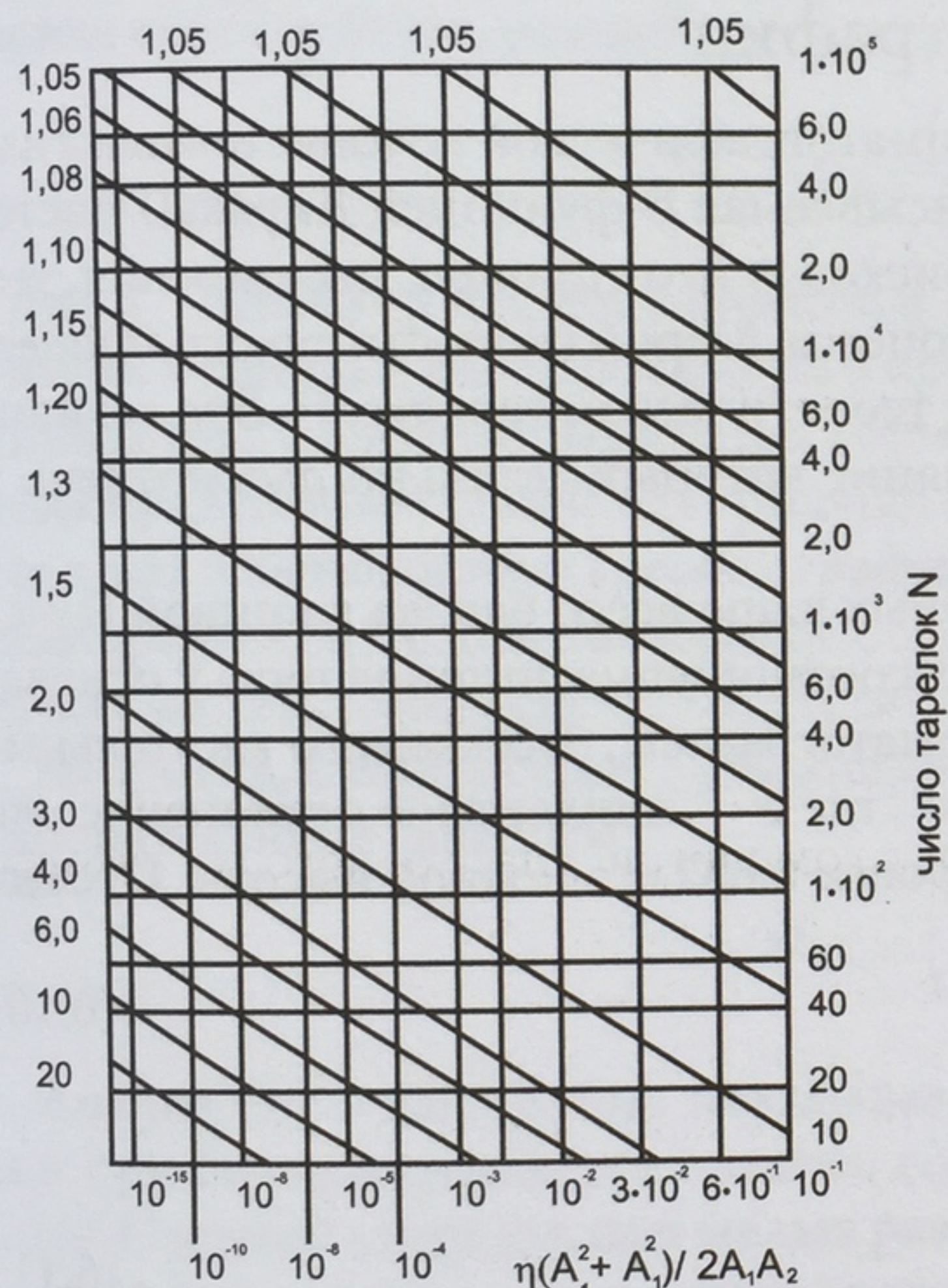


Рис. 6.3. Диаграмма для определения степени чистоты фракций, разделенных с помощью хроматографии

Внимательное рассмотрение рис. 6.3 показывает, что необходимое число теоретических тарелок резко возрастает с уменьшением α . Так, если допустимое количество примеси составляет 0,1%, то при $\alpha=1,5$ потребуется 300 теоретических тарелок (т.т.), при $\alpha=1,25$ потребуется уже 1200 т.т., а при $\alpha=1,15$ – около 5000 т.т. Так как в хроматографии в процессе разделения участвует в каждый момент времени только та часть колонки, на которой находится зона разделяемого вещества, иначе говоря, «только те теоретические тарелки, на которых в данный момент размещена хроматографическая зона», в общем, в хроматографии, для достижения заданной степени разделения требуется значительно большее (в 10–100 раз) число теоретических тарелок, чем при ректификации. Однако требуемая эффективность колонок достигается в хроматографии значительно легче, чем в дистилляции и ректификации.

Экспериментально эффективность хроматографической колонки определяют по формулам:

$$n = 16 \left(\frac{\tau_R}{a_0} \right)^2 = 5,6 \left(\frac{\tau_R}{a_{1/2}} \right)^2 \quad (6.9)$$

где τ_R – время удерживания; $a_{1/2}$ – ширина пика на половине его высоты (входящие в формулу величины обычно измеряют в миллиметрах длины диаграммной бумаги, на которой зарегистрирована хроматограмма).

Связь эффективности хроматографической колонки с основными параметрами процесса исследована в работе Ван-Деемтера, Цудервега и Клинкенберга [13], показавших, что высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ), сложным образом зависит как от особенностей применяемых подвижной и неподвижной фаз, так и от скорости подвижной фазы. Основные положения этого рассмотрения изложены в следующем разделе.

6.3. Зависимость эффективности разделения от параметров процесса хроматографии

В процессе поступательного движения по хроматографической колонке компактная вначале зона вещества (в идеальном случае описываемая δ -функцией Дирака!) постепенно расширяется. Чем менее интенсивно происходит этот процесс расширения, тем выше эффективность хроматографического процесса. Мерой скорости такого процесса расширения является высота, эквивалентная теоретической тарелке, H . Эта величина определяется рядом частных процессов, влияние которых детально рассмотрено в работах [12–19].

Для хроматографических пиков, форма которых чаще всего близка к кривой Гаусса [19], соблюдается характерное для таких кривых соотношение: ширина пика у основания a_0 , то есть длина отрезка нулевой линии хроматограммы, отсекаемого касательными к сторонам пика в точках перегиба, равна 4σ , где σ – стандартное отклонение для данного пика, численно равное его ширине на уровне 0,882 его полной высоты. Отсюда

$$n = \left(\frac{V_R}{\sigma} \right)^2 \quad (6.10)$$

и

$$H = L \left(\frac{\sigma}{V_R} \right)^2 \quad (6.11)$$

Если величины σ и V_R выразить в единицах длины колонки, то уравнение (6.11) легко преобразуется к виду

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (6.12)$$

откуда ясно видно, что величина H есть не что иное, как дисперсия хроматографического пика, отнесенная к единице длины колонки. Как известно, при любом случайном процессе результирующая дисперсия распределения является суммой вкладов отдельных факторов, определяющих полную ширину получающегося распределения. Это справедливо и для хроматографической зоны, расширяющейся в процессе движения по колонке под воздействием нескольких различных факторов, действующих независимо друг от друга. Основными из этих факторов являются неоднородность потока подвижной фазы, движущейся через зернистый слой сорбента, продольная диффузия

вещества в подвижной и неподвижной фазах от центра хроматографической полосы к зонам меньших концентраций вещества впереди и позади нее, сопротивление массопередаче как в подвижной, так и в неподвижной фазах. Последние два фактора, обуславливающие определенную неравновесность хроматографического процесса, часто оказывают наибольшее влияние.

Для жидкостной хроматографии существенна также неравновесность процесса внутри застойных зон в частицах сорбента. Таким образом, можно записать

$$H = \sum H_i = H_{inh} + H_{Dm} + H_{Dst} + H_{rs} + H_{rm} + H_{rst} \quad (6.13)$$

Здесь H_{inh} – вклад в ВЭТТ, обусловленный неоднородностью потока в пористом зернистом слое сорбента, равный

$$H_{inh} = 2\lambda d_p \quad (6.14)$$

где d_p – диаметр частиц сорбента, а λ – коэффициент равномерности заполнения, близкий к единице для относительно крупнозернистого сорбента и быстро увеличивающийся при уменьшении размера частиц. В том случае, когда хроматографическая колонка представляет собой однородный канал со стенками, покрытыми сорбирующим слоем, как в капиллярной хроматографии, величина H_{inh} считается равной нулю, так как неоднородности потока, связанные с его возмущениями при течении через слой дискретных частиц, в этом случае отсутствуют [9, 16].

Напротив, в жидкостной хроматографии высокого разрешения выражение для H_{inh} становится более сложным:

$$H_{inh} = \left(\frac{1}{2\lambda d_p} + \frac{D_m}{d_p^2 u} \right)^{-1} \quad (6.15)$$

Анализ этого выражения показывает, что при больших скоростях подвижной фазы и при больших диаметрах частиц сорбента d_p оно трансформируется в выражение (6.14). С другой стороны, при малых размерах частиц сорбента и малых скоростях подвижной фазы вклад этого фактора увеличивается пропорционально скорости и второй степени размера частиц.

$$H_{inh} = \frac{d_p^2 u}{D_m} \quad (6.16)$$

Таким образом, в жидкостной хроматографии оказывается возможным получать очень малые величины ВЭТТ, близкие к величине зерна применяемого сорбента. Это позволяет получать в жидкостной хроматографии очень высокую эффективность разделения вплоть до нескольких тысяч теоретических тарелок на колонках длиной всего лишь несколько сантиметров [20, 21].

Интересно отметить, что именно такое сочетание экспериментальных параметров характерно для первых хроматографических опытов М.С. Цвета [1]. В его экспериментах были использованы порошкообразные адсорбенты (мел, крахмал, инулин и др.) с диаметром зерна порядка 5–10 мкм, работавшие при очень малых перепадах давления (порядка 10^3 Па) и, следовательно, при малых скоростях подвижных жидких фаз. По современным расчетам при этом достигалась эффективность до 5 тыс. т.т. на колонках с

высотой слоя адсорбента около 5 см. Таким образом, величина ВЭТТ в опытах М.С. Цвета составляла всего лишь 10^{-2} мм. Такой результат вполне мог бы сделать честь любому современному исследователю.

Величина H_{D_m} представляет собой вклад продольной молекулярной диффузии в подвижной фазе

$$H_{D_m} = 2\gamma D_m / u \quad (6.17)$$

Здесь D_m – коэффициент диффузии вещества в подвижной фазе, γ – коэффициент, учитывающий затрудненность диффузии молекул в извилистых каналах внутри зерен сорбента и между ними. Эта величина для зернистых слоев сорбентов обычно равна 0,5-0,6 и приближается к единице для идеального полого капилляра. В знаменателе этого выражения стоит значение линейной скорости подвижной фазы u . Ясно, что чем выше будет скорость подвижной фазы, тем меньше времени проведет данное вещество в колонке и, соответственно, тем меньше будет вклад продольной молекулярной диффузии в величину общего расширения хроматографической зоны.

Вклад продольной молекулярной диффузии в неподвижной фазе, равный

$$H_{D_{st}} = \frac{2\gamma_s D_s k}{u} \quad (6.18)$$

пропорционален коэффициенту диффузии вещества в неподвижной фазе, обратно пропорционален скорости потока подвижной фазы u , в то же время, зависит от коэффициента емкости колонки k . Это связано с тем, что молекулы разных веществ проводят в неподвижной фазе разное время, которое и определяется величиной этого параметра.

В современных хроматографических системах обычно вклады продольной диффузии (6.17) и (6.18) относительно невелики. В газовой хроматографии пренебрежимо мал и не учитывается член $H_{D_{st}}$. Обычно невелик вклад этого члена и в большинстве вариантов жидкостной хроматографии.

Природа вклада H_{rst} , учитывающего сопротивление массопередаче в неподвижной фазе, может быть объяснена следующим образом. При наличии поступательного движения подвижной фазы в хроматографической колонке равновесное распределение концентраций сорбата между движущейся и неподвижной фазами, устанавливающееся в области, где в данный момент размещается этот сорбат, постоянно нарушается. В передней части зоны молекулы сорбата переносятся потоком подвижной фазы в область чистой неподвижной фазы, а в задней части зоны сорбент, содержащий сорбированные молекулы сорбата, приходит в соприкосновение с чистой подвижной фазой. Таким образом, в передней части зоны имеет место переход молекул сорбата из подвижной фазы в неподвижную, а в задней части зоны, наоборот, молекулы сорбата переходят из неподвижной фазы в подвижную. Естественно, что и в центральной части зоны имеет место миграция молекул из неподвижной фазы в подвижную и обратно, однако там эти процессы в значительной степени уравниваются. Такие межфазные переходы молекул происходят не мгновенно, но требуют некоторого времени, зависящего от скорости диффузии молекул в неподвижной фазе, от толщины слоя сорбента, который должна преодолеть отдельная молекула, чтобы перейти в подвижную фазу, от общего времени пребывания молекулы в неподвижной фазе. В результате этого часть молекул

отстает в своем движении по колонке от центра масс хроматографической полосы, тогда как другие молекулы переносятся потоком подвижной фазы вперед, опережая таким образом, основную массу вещества в хроматографической зоне. Это явление приводит к расширению зоны, которое может быть описано как дополнительный вклад, увеличивающий высоту, эквивалентную теоретической тарелке. В результате решения описывающей этот процесс системы дифференциальных уравнений получено следующее выражение для такого вклада [17, 18, 22–24]:

$$H_{rs} = \frac{8}{\pi^2} \cdot \frac{k}{(1+k)} \cdot \frac{d_f^2}{D_{st}} u \quad (6.19)$$

Здесь k – коэффициент емкости колонки, d_f – толщина пленки неподвижной жидкой фазы (или длина пути диффузии в твердом адсорбенте), D_{st} – коэффициент диффузии сорбата в неподвижной фазе, u – линейная скорость подвижной фазы. Такое немгновенное установление концентрационного равновесия между фазами в хроматографической колонке часто рассматривают как результат наличия определенного сопротивления массопереносу в неподвижной фазе, связанного с конечной скоростью диффузии в ней молекул сорбата.

Для коэффициента диффузии D_{st} в адсорбционной хроматографии принимают величину, несколько меньшую, чем коэффициент диффузии в подвижной фазе, так как миграция молекул в толщу зерна адсорбента происходит в извилистых порах, заполненных подвижной фазой. При этом скорость диффузии молекул сорбата в толщу адсорбента (скорость внутренней диффузии) оказывается много меньшей, чем скорость самих процессов адсорбции и десорбции. Особенно четко это проявляется в случае жидкостной хроматографии [20, 21]. В подвижной фазе имеют место неравновесные явления, аналогичные рассмотренным выше. Сопротивление массопередаче в подвижной фазе вносит вклад в величину ВЭТТ, равный

$$H_{rm} = \frac{\omega d_p^2}{2 D_m} u \quad (6.20)$$

где d_p – диаметр частиц сорбента, а ω – константа, приближенно учитывающая вклады неравновесных явлений в каналах между частицами сорбента, внутри частиц в полостях, заполненных подвижной фазой, между потоками, движущимися в пористой среде с различными скоростями и т.п. Вклад H_{rm} быстро уменьшается при уменьшении размеров зерен сорбента.

Для капиллярных колонок величина этого вклада равна [16]:

$$H_{rm} = \frac{(1 + 6k + 11k^2)}{24(1 + k^2)} \cdot \frac{d_c^2}{4 D_m} \cdot u \quad (6.21)$$

В этом выражении одновременно учитывается и вклад в величину ВЭТТ, связанный с параболическим распределением скоростей по диаметру полой капиллярной колонки.

Наконец, влияние диффузии сорбата в застойные зоны в слое сорбента предложено описывать выражением

$$H_{rst} = \frac{C_{st} d_p^2 u}{D_m} \quad (6.22)$$

Здесь C_{st} – коэффициент, учитывающий константу сорбционного равновесия и геометрию сорбционного слоя [25].

Величина ВЭТТ, найденная суммированием величин, определяемых уравнениями (6.12) – (6.22), может быть представлена в упрощенном виде как сумма членов, не зависящих от скорости подвижной фазы (в первом приближении), членов пропорциональных скорости и членов, обратно пропорциональных ей:

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma Dm}{4} + \frac{8}{\pi^2} \cdot \frac{k}{(1+k)^2} \cdot \frac{d_p^2}{D_{st}} u \quad (6.23)$$

или

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

где A , B и C – константы. В таком виде это выражение представляет собой известное уравнение Ван-Деемтера [13], хорошо выполняющееся и в жидкостной, и в газовой

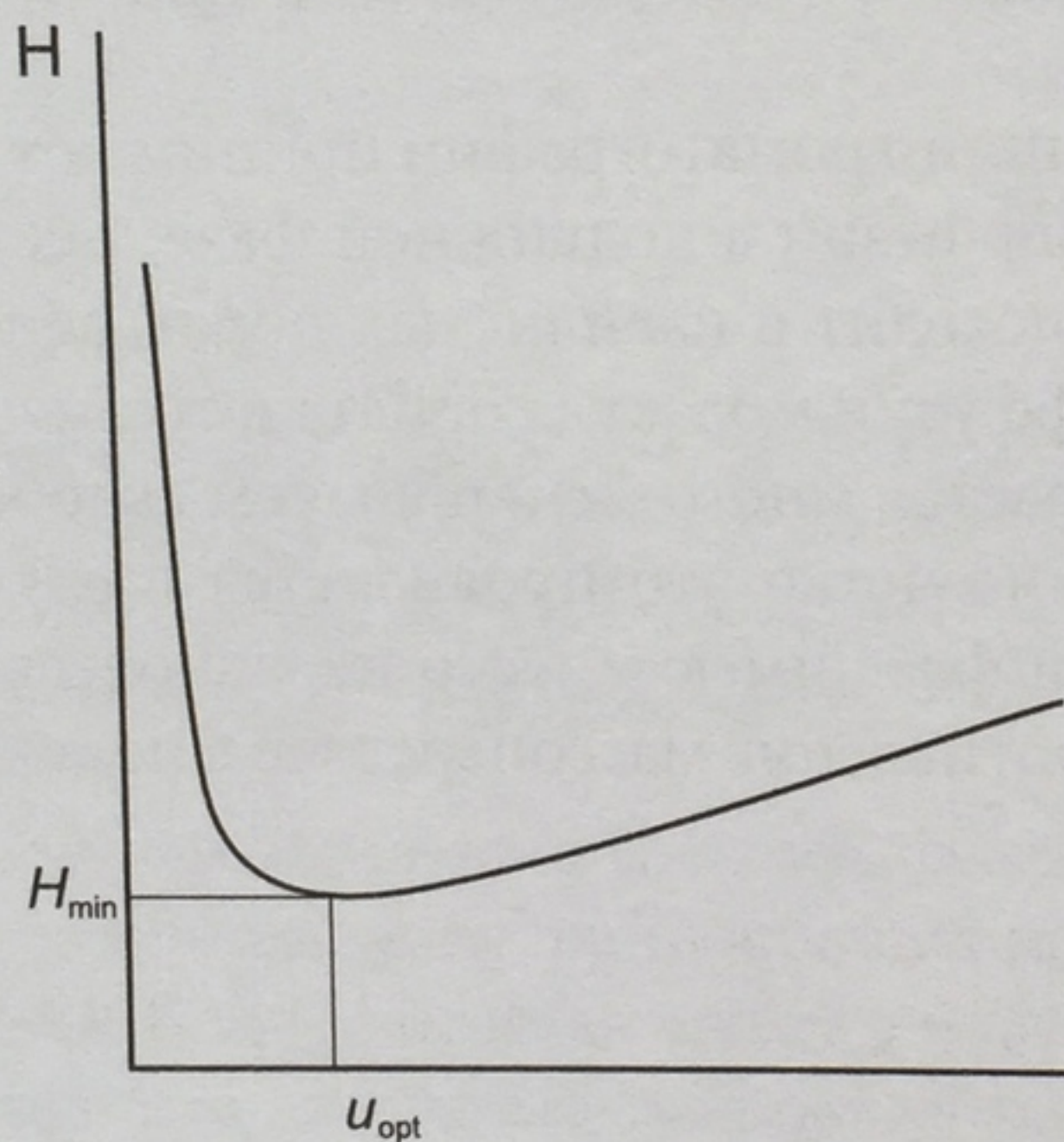


Рис. 6.4. Кривая Ван-Деемтера

хроматографии при не слишком малых скоростях подвижной фазы. Легко видеть, что выражение (6.23) – это уравнение гиперболы (рис. 6.4) с минимумом при

$$u_{opt} = \sqrt{B/C} \quad (6.24)$$

и с асимптотой $H = Cu$.

В этом случае минимальная высота, эквивалентная теоретической тарелке, H_{min} , равна

$$H_{min} = A + 2\sqrt{BC} \quad (6.25)$$

Если в уравнении (6.23) считать вклад продольной молекулярной диффузии пренебрежимо малым, что действительно имеет место при $u > u_{opt}$, то это уравнение можно представить в форме

$$H = A + C u \quad (6.26)$$

Экстраполируя это выражение к нулевому значению скорости подвижной фазы, можно получить величину A :

$$H_0 = A = 2\gamma d_p \quad (6.27)$$

Показателем высокого качества заполнения хроматографической колонки, то есть высокой степени упорядоченности слоя заполняющих ее частиц сорбента, является близость к единице параметра γ . Следовательно, в хорошо приготовленной хроматографической колонке предельно достижимое значение ВЭТТ может быть близким к удвоенному диаметру заполняющих колонку частиц сорбента:

$$H_{\text{lim}} \cong 2 d_p \quad (6.28)$$

При математическом анализе процессов высокоэффективной хроматографии удобно пользоваться приведенными параметрами:

приведенной высотой, эквивалентной теоретической тарелке,

$$h = \frac{H}{d_p} \quad (6.29)$$

и приведенной скоростью подвижной фазы

$$v = \frac{u}{u_{\text{opt}}} \quad (6.30)$$

В жидкостной хроматографии при использовании колонок, заполненных мелкими однородными по размерам частицами сорбента, заполняющими колонку без пустот и неоднородностей плотности заполнения, в соответствии с уравнением (6.15) ВЭТТ может быть даже меньше, чем $2d_p$. Именно это обстоятельство дает основание относить современные варианты жидкостной хроматографии к высокоэффективным хроматографическим процессам, в которых достигается удельная эффективность до 50 тыс. т.т./м при длине колонок 50–250 мм. Полная эффективность разделения в этих процессах составляет обычно 2–10 тыс. т.т., при максимально полном использовании возможностей применяемого сорбента и всей хроматографической системы.

Из проведенного рассмотрения следует, что имеется два пути для увеличения эффективности хроматографического разделения, по крайней мере, в принципе. Один из этих путей, по-существу, экстенсивный, сводится просто к увеличению пути, проходимого хроматографической зоной по слою сорбента. И в газовой, и в жидкостной хроматографии это означает простое увеличение длины разделительных колонок.

Второй путь, который следует рассматривать как интенсивный, заключается в том, чтобы в возможно более полной степени удовлетворить требования к условиям хроматографического эксперимента, вытекающие из анализа взаимосвязей между параметрами хроматографического опыта и его результатами. Если считать, что такая взаимосвязь удовлетворительно описывается уравнением Ван-Деемтера, то можно заключить, что увеличения общей эффективности разделения в хроматографическом процессе, то есть максимального уменьшения высоты, эквивалентной теоретической тарелке

(ВЭТТ), можно добиться, уменьшая те параметры этого уравнения, которые вносят наиболее существенный вклад в величину ВЭТТ. В практически приемлемых условиях это первый и третий члены уравнения Ван-Деемтера.

Первый член

$$H_{inh} = \left(\frac{1}{2\lambda d_p} + \frac{D_m}{d_p^2 u} \right)^{-1} \quad (6.31)$$

можно уменьшить, применяя сорбент с возможно малой величиной зерна и с минимальным разбросом его размеров. Это успешно выполняется в высокоэффективной жидкостной хроматографии путем применения специально приготовленных сорбентов с зернами строго сферической формы при очень малом разбросе их размеров (рис. 6.5). Применение таких сорбентов с размером зерна 5, 3 и даже 2 мкм в сочетании с особыми приемами заполнения колонок позволило уверенно получать колонки с эффективностью до 2500 т.т./см [26–28]. При длине колонок для жидкостной хроматографии высокого разрешения 4–5 см их полная эффективность достигает 10–15 тыс.т.т., что, несомненно, следует рассматривать как весьма высокий результат. Именно такие результаты и дают основания для наименования этого варианта хроматографического метода высокоэффективной жидкостной хроматографией. Ситуация, связанная с влиянием сопротивления массообмену на эффективность хроматографического разделения, более сложна. Увеличение скорости подвижной фазы приводит к нарушению равновесия между подвижной и неподвижной фазами. Феноменологически это проявляется в том, что зона компонента в неподвижной фазе как бы отстает от зоны в подвижной фазе. Это приводит к размыванию хроматографической зоны, характерному для неидеальной хроматографии. Такое размывание может быть описано как определенный вклад в эффективный коэффициент диффузии в колонке, описываемый третьим членом уравнения Ван-Деемтера, S_i . Этот вклад пропорционален скорости подвижной фазы и зависит от величины пути диффузии в неподвижной фазе (толщины сорбционного слоя или толщины пленки неподвижной фазы d_f) и от сорбционного коэффициента данного вещества k . Стремление уменьшить эти величины привело к созданию пелликулярных (поверхностно-слойных) сорбентов в жидкостной хроматографии (см. ниже).

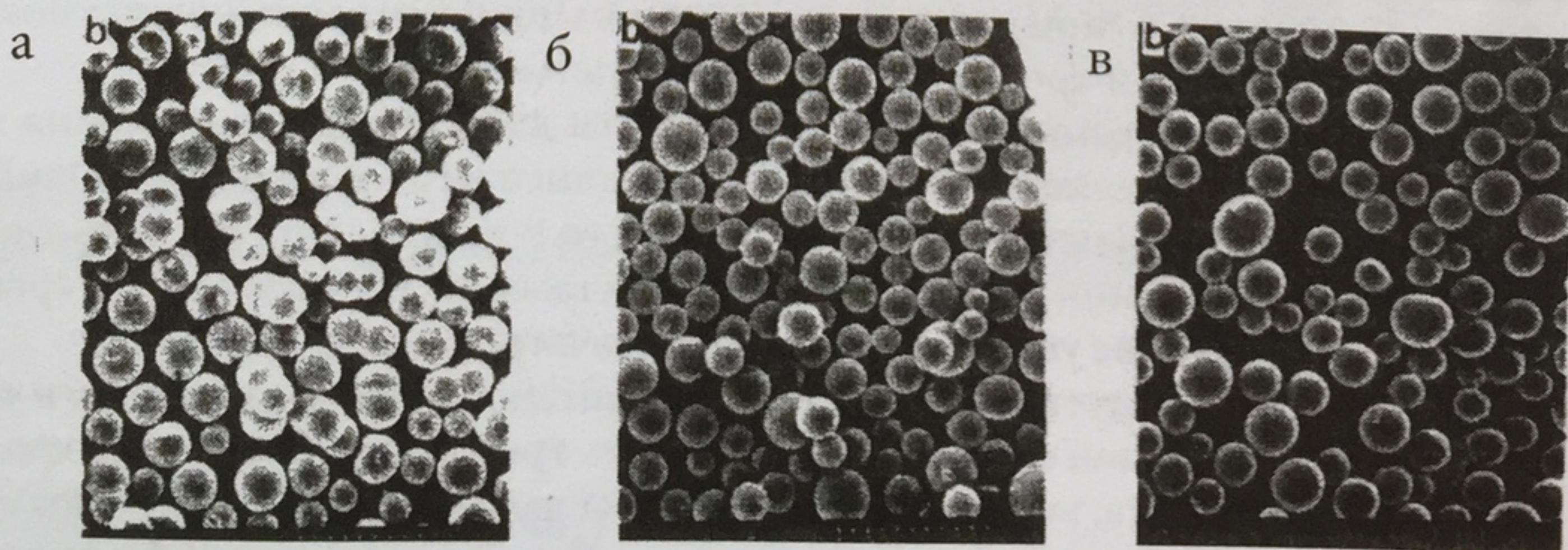


Рис. 6.5. Микрофотографии сорбентов для высокоэффективной жидкостной хроматографии: а – Зорбакс; б – Хромасил; в – Видак, Увеличение 1:1000

6.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография

В большой группе хроматографических процессов в качестве подвижной фазы используются жидкости. Применение жидкостей для этой цели имеет ряд преимуществ. Жидкие подвижные фазы обладают высокой растворяющей способностью в широком диапазоне температур между температурой их затвердевания и точкой кипения. Жидкие подвижные фазы способны растворять и переносить через хроматографическую колонку при комнатной температуре такие вещества, которые не переходят в газообразное состояние вследствие их высокой молекулярной массы, очень малой упругости пара или недостаточной устойчивости при повышенных температурах.

Первые эксперименты в области жидкостной хроматографии были проведены первооткрывателем хроматографического метода М.С. Цветом уже в 1903 г. [1, 2]. В этих опытах были использованы в качестве подвижных фаз различные органические растворители, а неподвижными фазами служили разнообразные органические и неорганические порошкообразные адсорбенты, в том числе мел, оксид магния, крахмал, инулин и др. Были показаны возможности разделения в этих системах таких веществ, как окрашенные в разные цвета соединения, входящие в состав хлоропластов растений, за счет различий в энергиях их адсорбционного взаимодействия с применяемыми адсорбентами. Это определило наименование использованного Цветом варианта хроматографии как жидкостной адсорбционной хроматографии. До 1950 г. были разработаны и другие варианты хроматографического метода, использующие жидкие подвижные фазы. Среди них следует отметить распределительную хроматографию, в которой неподвижной фазой служит жидкость, несмешивающаяся с подвижной фазой [29, 30]; ионообменную хроматографию, в которой стационарной фазой является твердый адсорбент, способный к обмену ионами с веществами, подлежащими разделению [31]; эксклюзионную или ситовую хроматографию, в которой разделение осуществляется за счет различий в скоростях диффузии молекул разделяемых веществ в микропоры твердого адсорбента [32] и аффинную хроматографию, использующую специфические взаимодействия фермента и соответствующего субстрата или антигена с антителом [33].

В течение довольно долгого времени жидкостную хроматографию использовали преимущественно для препаративного разделения разнообразных веществ. При этом применяли колонки диаметром 10–50 мм и длиной 5–100 см, а используемые адсорбенты имели частицы неправильной формы с достаточно широким диапазоном размеров от 20–35 до 200–300 мкм [34, 35]. Столь значительные различия в размерах частиц неподвижной фазы, а также наличие в адсорбентах существенной примеси очень мелких пылевидных фракций определяли достаточно высокое гидравлическое сопротивление применявшихся колонок. Как правило, подачу подвижной фазы осуществляли под гидравлическим давлением применяемого растворителя, обычно не превышавшим 0,5–1 м водяного столба (0,05–0,1 кг/см²). В таких условиях скорость подвижной фазы была весьма незначительной, так что длительность хроматографического опыта измерялась многими часами, а часто даже днями и неделями. Эффективность таких процессов также была весьма умеренной, что не позволяло разделять близкие по своим свойствам компоненты или многокомпонентные смеси веществ. Тем не менее жидкостная хроматография даже в этих несовершенных формах во многих случаях превосходила по своей разделяющей способности другие известные в то время методы разделения веществ, такие как дистилляция, ректификация, экстракция, дробная кристаллизация и др.

Период времени с 1950-го до 1965 г. после открытия газовой хроматографии [10-14] характеризовался интенсивными исследованиями закономерностей хроматографических процессов и поисками путей достижения их максимально возможной разделяющей способности [36-47]. Эти исследования были направлены прежде всего на повышение эффективности процессов газовой хроматографии. С самого начала было достаточно очевидно, что выявленные в этих исследованиях закономерности и условия достижения высокой разделяющей способности должны быть в равной мере применимы не только к газовой хроматографии, но и к процессам жидкостной хроматографии при надлежащем учете различий в свойствах применяемых подвижных фаз. Это в первую очередь связано с различиями в вязкости подвижных фаз и, как следствие, с различиями в их коэффициентах диффузии. Вязкость газов составляет 10^{-3} – 10^{-5} сПз. В то же время вязкость жидкостей в большинстве случаев находится в пределах 0,2–2 сПз, а для таких веществ, как этиленгликоль, достигает 16,5 сПз. Таким образом, вязкость жидких подвижных фаз превосходит вязкость газов в 100–1000 раз. С другой стороны, жидкости отличаются от газообразных сред своей исключительно малой сжимаемостью. Поэтому жидкости практически не изменяют своего объема при повышении давления по крайней мере до 100 кг/см², так что распределение давлений в колонке, заполненной мелкодисперсным адсорбентом, с хорошей точностью подчиняется линейному закону. Вследствие малой сжимаемости жидкости объем элюента, покидающего хроматографическую колонку, с хорошей точностью равен объему подвижной жидкой фазы, поступающего в нее. Возвращаясь к соотношениям, рассмотренным выше, можно отметить, что в соответствии с уравнением Ван-Деемтера, минимальное значение высоты, эквивалентной теоретической тарелке, может быть выражено соотношением (6.23), где величина $A = 2\lambda d_p$ не зависит от свойств подвижной фазы.

Член B в жидкостной хроматографии примерно пропорционален коэффициенту диффузии в жидкости:

$$B \sim D_{lq} \quad (6.32)$$

В знаменателях выражений для вкладов в ВЭТТ H_{rs} , H_{sm} и H_{sz} содержатся коэффициенты диффузии разделяемых веществ в подвижной и в неподвижной фазах. В то же время эти выражения пропорциональны скорости подвижной фазы в колонке. Предполагая, что эти коэффициенты в жидкостной хроматографии близки по величине, можно считать, что в первом приближении множитель C в уравнении Ван-Деемтера обратно пропорционален коэффициенту диффузии в жидкости:

$$C \sim 1/D_{lq} \quad (6.33)$$

В то же время, фактически достижимая величина ВЭТТ быстро возрастает с увеличением скорости подвижной фазы вследствие относительно более высокого значения параметра C в уравнении Ван-Деемтера. Это определяет необходимость работать в жидкостной хроматографии при скоростях подвижной фазы, как можно более близких к оптимальным или очень немного их превышающих. В этом случае минимальное значение ВЭТТ в жидкостной хроматографии будет определяться, в основном, размерами частиц адсорбента d_p и качеством заполнения колонки, отражающимся в величине множителя λ .

Понимание этих простых соотношений и их распространение на процессы жидкостной хроматографии было достигнуто в 1962–1965 гг. благодаря усилиям большой группы исследователей, многие из которых уже имели в то время солидный опыт работы в газовой хроматографии [34, 35, 37, 38, 44, 48, 49].

Обратив внимание вновь на выражения для вкладов в ВЭТТ в уравнении Ван-Демтера H_{rs} , H_{rm} , H_{rst} , легко понять, что эти вклады прямо пропорциональны первой или второй степени геометрического параметра, отражающего влияние пути диффузии в подвижной и в неподвижной фазах хроматографической системы. Вклады H_{rst} и H_{rm} пропорциональны квадрату величины частицы адсорбента d_p^2 для наполненных колонок [уравнения (6.18) и (6.19)] или квадрату диаметра капиллярной колонки [уравнение (6.17)]. Влияние сопротивления массообмену в неподвижной фазе [уравнение (6.20)] пропорционально второй степени пути диффузии в этой фазе. В качестве этой величины наиболее часто применяют толщину мономолекулярной пленки на поверхности применяемого адсорбента либо некоторую часть размера его зерен (обычно весьма небольшую). Это касается адсорбционной хроматографии, которая является наиболее часто применяемым вариантом жидкостной хроматографии. В обоих случаях величина этих вкладов оказывается в несколько десятков или сотен раз меньшей, чем в газовой хроматографии. Отсюда становится ясным, что для снижения влияния неравновесных процессов в жидкостной хроматографии необходимо значительно уменьшать размеры зерна применяемых адсорбентов, что приводит к соответствующему уменьшению пути диффузии молекул разделяемых веществ из потока подвижной фазы к поверхности адсорбента и обратно.

Первые шаги в направлении значительного улучшения кинетических характеристик на всех стадиях жидкостно-хроматографического процесса были осуществлены именно на основе вышеизложенных принципов. Вначале для этой цели были использованы адсорбенты, в каждом зерне которых твердое непористое ядро было покрыто тонким адсорбирующим слоем толщиной 1–2 мкм. Такими пелликулярными или поверхностно-пористыми адсорбентами были, например, стеклянные шарики диаметром 50–100 мкм со сформированным на поверхности пористым адсорбирующим слоем толщиной 1–2 мкм. Такие слои могут быть сформированы путем прилипания к поверхности непористых стеклянных сфер очень малых адсорбирующих микрочастиц размером 1–2 мкм или травлением поверхности стекла подходящими кислотными или щелочными агентами [14, 15, 22–24].

Ясно, что значение геометрического фактора, описывающего вклад сопротивления массопередаче в ВЭТТ, будет тем менее, чем меньше фактическая величина зерна применяемого адсорбента. Можно ожидать, что эта величина будет близка к толщине адсорбционного слоя на поверхности частицы пелликулярного адсорбента [22, 28]. Однако таким адсорбентам присущи определенные недостатки сугубо хроматографического характера, хотя они и позволяют существенно улучшить кинетические характеристики процесса. В частности, такие адсорбенты обладают очень малой адсорбционной емкостью, что представляется вполне естественным, так как в колонке, заполненной такими адсорбентами, активно работает всего лишь 2–10% полного объема слоя адсорбента. Поэтому колонки с такими адсорбентами способны разделять лишь очень малые пробы во избежание перегрузки и значительной потери своей эффективности. Это обстоятельство предъявляет повышенные требования к чувствительности детектирующей системы и обуславливает необходимость обеспечения очень малых объемов устройств

для ввода проб, соединительных коммуникаций и других элементов хроматографической системы [16, 21–23, 34, 36]. По этой причине более распространенным в жидкостной хроматографии стало применение таких адсорбентов, в которых активно работающий адсорбционный материал охватывает весь объем частиц, однако сами эти частицы имеют очень малые размеры (10, 5, 3 или даже 2 мкм) [20, 21, 45]. Помимо столь малых размеров частиц, эти адсорбенты обладают еще двумя специфическими особенностями: дисперсия размеров частиц этих адсорбентов очень невелика, а сами частицы имеют строго сферическую форму [17, 21, 46]. Более того, на основании результатов многочисленных экспериментов была разработана особая техника заполнения колонок, обеспечивающая строго равномерную структуру слоя адсорбента без каких-либо пустот, областей пониженной плотности и других неравномерностей [24, 47, 48].

Все эти меры в целом привели к тому, что члены d_f и d_p , характеризующие сопротивление массопередаче в подвижной и в неподвижной фазах оказались в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) близкими между собой.

Многочисленными экспериментальными исследованиями установлено, что различные процессы, вызывающие расширение хроматографических зон в современной жидкостной хроматографии, вносят вклады в ВЭТТ, имеющие следующий порядок величины [19, 50]:

Вихревая диффузия, $2\lambda_d$	10^{-3} см;
Молекулярная диффузия в подвижной фазе	10^{-3} см;
Молекулярная диффузия в неподвижной фазе	10^{-6} см;
Сопротивление массопередаче	10^{-4} см

Из этих величин следует, что наибольший вклад в расширение полосы в жидкостной хроматографии на слоях адсорбентов с частицами величиной 5 мкм вносит вихревая диффузия и сопротивление массопередаче в подвижной и неподвижной фазах. Таким образом, величина ВЭТТ в высокоэффективной жидкостной хроматографии определяется, в первую очередь, размерами частиц применяемого адсорбента.

Проведенное здесь рассмотрение, конечно, носит очень упрощенный характер. Однако оно достаточно ясно показывает, что наибольшие вклады в процесс расширения хроматографической полосы в жидкостной хроматографии вносят процессы вихревой и молекулярной диффузии. Эти вклады пропорциональны первой или второй степени диаметра частиц применяемого адсорбента. Именно эти зависимости определяют необходимость использовать в жидкостной хроматографии более мелкозернистые адсорбенты с размером частиц 10, 5, 3 и даже 2 мкм (рис. 6.5). Это позволяет достигать эффективностей разделения до 3–5 тыс. т.т. при длине колонок 3–5 см (ВЭТТ около 10 мкм) или 10^5 т.т./м. Это дало основания для того, чтобы считать современную модификацию хроматографического процесса с жидкой подвижной фазой самостоятельным методом, называемым высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Его осуществляют с помощью достаточно сложных и совершенных приборов – жидкостных хроматографов. Схема такого прибора приведена на рис. 6.6. В его состав входят источник (резервуар) подвижной фазы, насос, обеспечивающий подачу подвижной фазы в колонку при достаточном давлении, устройство для ввода проб (специальный кран или система для ввода проб микрошприцем), хроматографическая колонка и детектор, регистрирующий разделенные вещества, покидающие колонку. В состав такого прибора могут также входить вспомогательные устройства, предназначенные для сглаживания

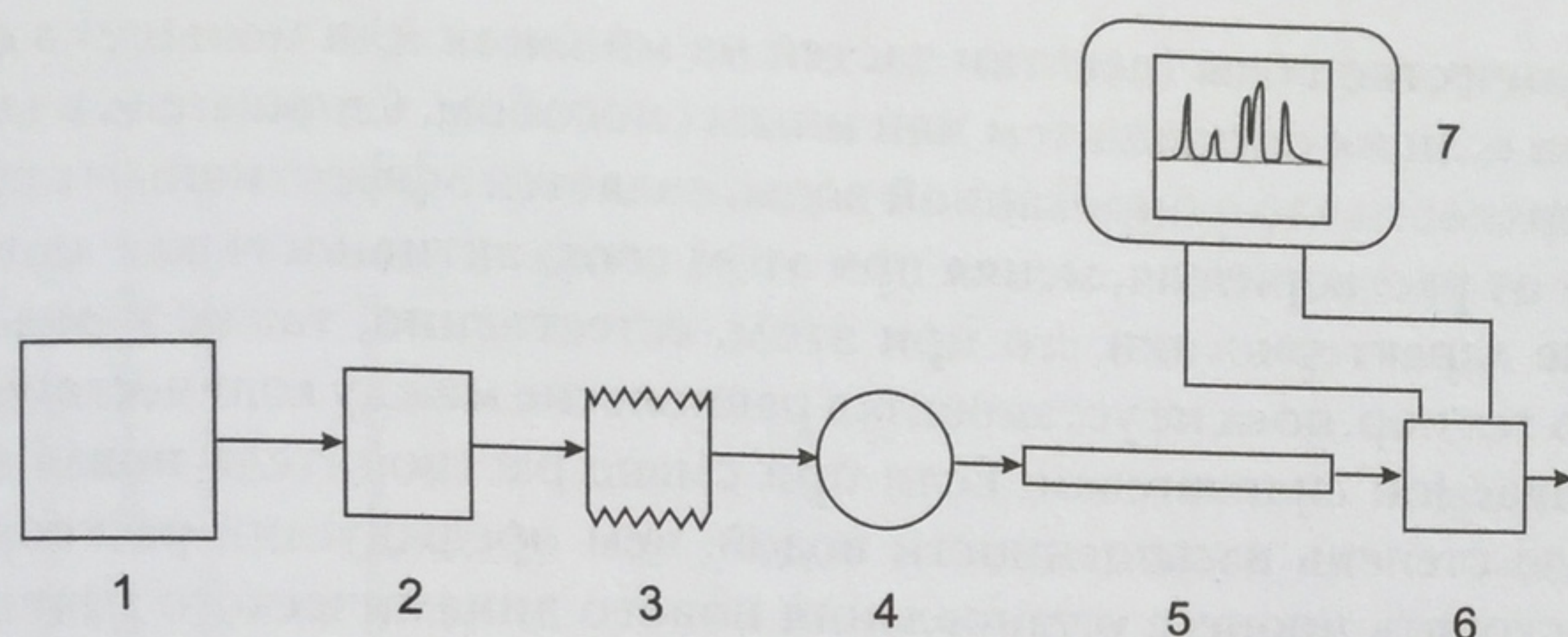


Рис. 6.6. Схема современного хроматографа: 1 – источник подвижной фазы (резервуар с жидким растворителем, баллон со сжатым газом, электролизер, кипятильник-парогенератор и т.п.); 2 – насос для подачи жидкой подвижной фазы; 3 – регулятор скорости потока подвижной фазы, демпфер – успокоитель колебаний давления; 4 – устройство для ввода проб; 5 – хроматографическая колонка; 6 – детектор покидающих колонку фракций; 7 – регистрирующее устройство (самописец или ЭВМ).

пульсаций давления, для удаления растворенных газов из применяемых растворителей и т.п. Некоторые сведения об аппаратуре для ВЭЖХ приведены в следующей главе.

6.5. Адсорбционная жидкостная хроматография

Разделение веществ методом адсорбционной жидкостной хроматографии осуществляется в результате их взаимодействия с адсорбентами, такими как силикагель или оксид алюминия, имеющими на поверхности активные центры. Различие разных компонентов анализируемой пробы в их способности к взаимодействию с адсорбционными центрами приводит к разделению их на отдельные зоны в процессе движения по колонке с подвижной фазой. Достигаемое при этом разделение зон компонентов зависит от взаимодействия как с адсорбентом, так и с растворителем (с подвижной фазой). В большинстве случаев адсорбенты, применяемые в настоящее время в жидкостной хроматографии, несут на своей поверхности полярные гидроксильные группы. Это определяет достаточно полярные свойства поверхности адсорбента и, соответственно, достаточно энергичное их взаимодействие с полярными соединениями, к числу которых относится большинство наркотических и допинговых веществ. Подвижными фазами в таких случаях обычно служат малополярные растворители типа углеводородов или их хлорсодержащие производные типа хлористого метилена. Такие хроматографические процессы, в которых используются адсорбенты с полярными свойствами в сочетании с неполярными подвижными фазами, принято называть нормально-фазовыми процессами. В том случае, если поверхность адсорбента модифицирована так, что ей приданы неполярные свойства (например, если поверхность адсорбента покрыта слоем неполярной жидкости или модифицирована путем химической прививки неполярных групп, например, углеводородных радикалов C_2-C_{18}), обычно в качестве подвижных фаз используют высокополярные жидкости (водные растворы солей или полярных органических веществ, таких как спирты или ацетонитрил). В этом случае хроматографический процесс называют обращенно-фазовым.

Было обнаружено, что поддерживать колонку с силикагелем в таких условиях работы, при которых времена удерживания и получаемое разделение оставались бы стабильными, достаточно трудно. Это связано с тем, что углеводороды, используемые в качестве основных подвижных фаз (*n*-гексан, *n*-гептан, изооктан), обычно содержат

очень небольшое количество воды (десятки частей на миллион или меньше) в состоянии насыщения, даже если их осушали тем или иным способом. Силикагель в колонке, не имеющий на поверхности адсорбированной воды, является эффективным осушителем и отнимает воду от растворителя, меняя при этом свою активность как адсорбент. Хроматографические характеристики его при этом, естественно, также изменяются. Это продолжается до тех пор, пока не установится равновесие между количеством воды, поглощаемой и отдаваемой силикагелем. Если при смене растворителя новая партия его будет иметь иную степень насыщенности водой, чем предыдущий растворитель, то снова будет происходить процесс установления нового динамического равновесия, и хроматографические характеристики снова изменятся. Аналогичный процесс может идти и в обратном направлении, когда растворитель хорошо высушен, а силикагель содержит много адсорбированной воды.

Существуют методы, которые позволяют получить воспроизводимые хроматографические характеристики колонки с силикагелем. Один из них заключается в использовании безводного гексана, модифицированного для получения нужной селективности метилхлоридом или ацетонитрилом. Так как их содержание в гексане существенно выше, чем воды, равновесие устанавливается существенно быстрее, и его легче поддерживать. Тем не менее при этом задача получения безводного растворителя сохраняется.

В другом методе с использованием гексана при его модификации водой применяют так называемую систему контролируемой влажности (СКВ). Метод основан на создании замкнутого цикла растворителя, который после детектора возвращается в систему через большую колонку с обогреваемой термостатом рубашкой. Большая колонка содержит силикагель или оксид алюминия (увлажненные) и служит для удерживания компонентов разделенных проб и поддержания требуемой влажности гексана. Увеличивая или понижая температуру в рубашке, можно изменять количество воды в циркулирующем гексане и, следовательно, менять параметры удерживания аналитической колонки. Подробно устройство и работа системы СКВ описаны в литературе [51].

При анализе веществ, достаточно сильно взаимодействующих с силикагелем, например, фенолов или спиртов, алифатические углеводороды часто модифицируют спиртами, например изопропанолом. На рис. 6.7 представлена хроматограмма, демонстрирующая высокую селективность при разделении сложной смеси наркотических веществ [52].

Популярность силикагеля в качестве адсорбента для ВЭЖХ начала падать с появлением и ростом применения полярных сорбентов с привитыми на поверхности функциональными группами, такими как аминные, нитрильные и диольные. Такие сорбенты более удобны в работе и позволяют легче подбирать селективность, меняя подвижную фазу. Тем не менее у силикагеля имеются свойства, которые обеспечивают ему достаточно надежное будущее в ВЭЖХ. Это прежде всего относительная дешевизна силикагеля, дающая ему большие преимущества при препаративных separations, особенно в том случае, когда масштаб их приближается к промышленному. Это хорошая механическая прочность, возможность в широких пределах регулировать размер и объем пор, возможность отмыть кислотой от ионов металлов переменной валентности, прокалить при высокой температуре и т.д. [53–55].

Недостатки адсорбционной хроматографии, ограничивающие ее использование. К таким недостаткам прежде всего следует отнести большую длительность процессов

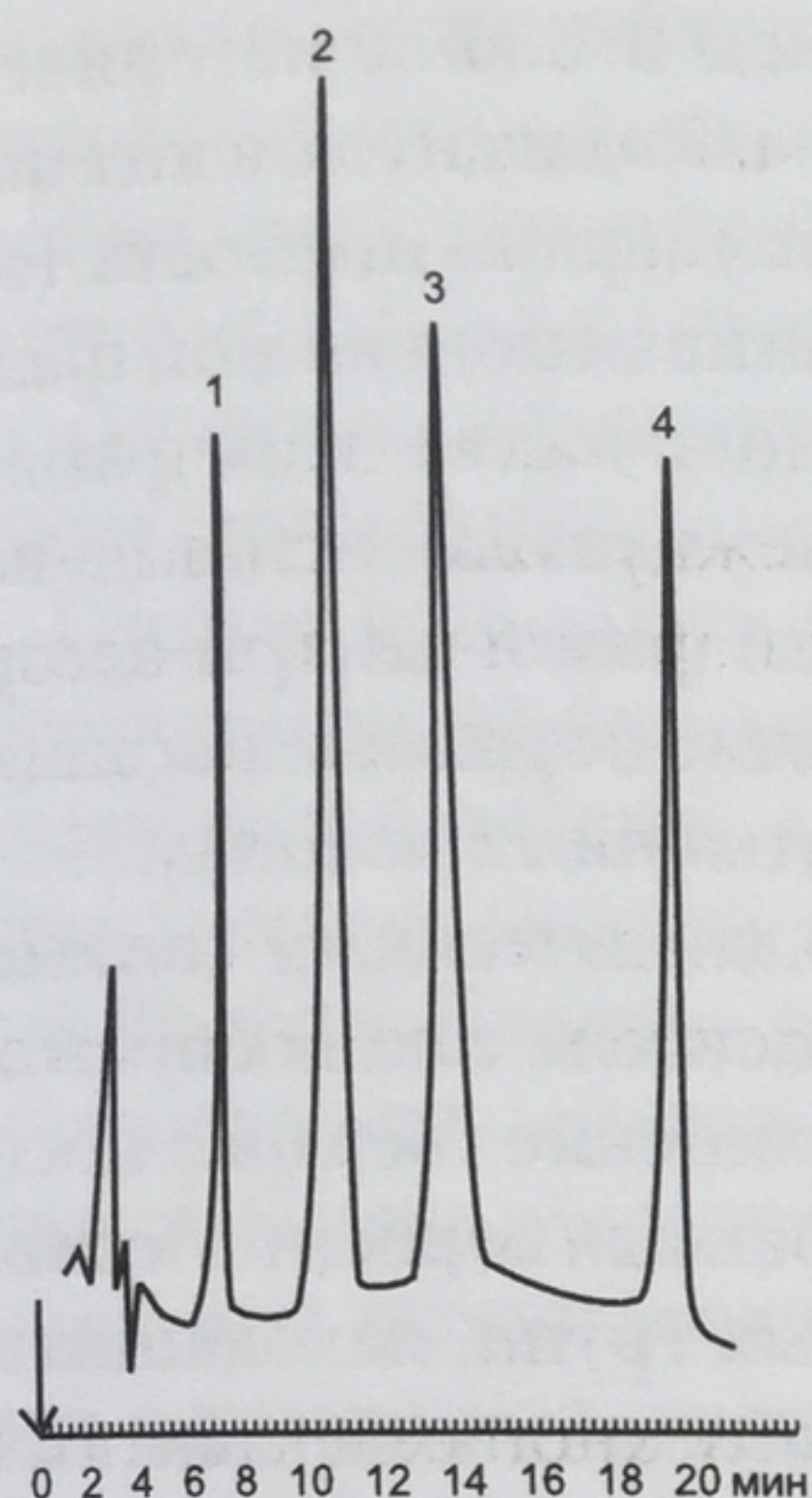


Рис. 6.7. Хроматограмма модельной смеси алкалоидов опия: 1 – морфин; 2 – кодеин; 3 – дионин; 4 – папаверин. Колонка размером 64 x 2 мм; сорбент Сепарон C_{18} , размер зерна 5 мкм; подвижная фаза ацетонитрил–0.01М раствор ацетата аммония (7:13); скорость подачи подвижной фазы 100 мкл/мин; объем пробы 2 мкл

уравновешивания адсорбентов с растворителями, содержащими воду в микроколичествах, и трудность приготовления таких растворителей с определенной и воспроизводимой влажностью. Это приводит к плохой воспроизводимости параметров удерживания, разрешения, селективности. По этой же причине невозможно использовать градиентное элюирование, то есть разделение с постепенным увеличением содержания полярного компонента в применяемом элюенте, так как возврат к исходному состоянию настолько длителен, что значительно превосходит выигрыш времени за счет использования градиента.

Существенные недостатки адсорбентов, особенно оксида алюминия, связанные с частыми случаями перегруппировок и разложения чувствительных к катализу соединений, необратимой сорбции, также широко известны и неоднократно отмечались в литературе. Необратимо сорбирующиеся вещества, накапливаясь на начальном участке колонки, меняют природу сорбента, могут привести к повышению сопротивления колонки или даже к полной ее забивке. Последний недостаток может быть устранен путем использования предколонки, которая по мере повышения сопротивления вследствие засорения заменяется на новую или перезаполняется новым сорбентом. Однако необратимая сорбция, имеющая место и в этом случае, приводит к получению хроматограмм, на которых полностью или частично отсутствуют пики чувствительных к адсорбции или каталитическому разложению компонентов пробы, либо существенно искажаются их количественные соотношения.

Все эти недостатки обусловили широкое распространение существенно более мягкого в химическом отношении метода распределительной хроматографии.

6.6. Распределительная хроматография

Распределительная хроматография – это вариант метода ВЭЖХ, в котором разделение смеси на составляющие ее компоненты осуществляется за счет различия их коэффициентов распределения между двумя несмешивающимися жидкими фазами: растворителем (подвижная фаза) и жидкой фазой на сорбенте (неподвижная фаза). Этот метод был предложен в 1941 г. Мартином и Синджем [29] и получил очень широкое

распространение в форме хроматографии на бумаге (см. ниже). В ВЭЖХ исторически первыми были абсорбенты, которые получали нанесением подходящих жидких фаз (оксидипропионитрила, парафинового масла и др.) на пористые твердые носители. Недостатком таких сорбентов было относительно быстрое смывание неподвижной фазы с твердого носителя потоком подвижной фазы. За счет этого количество этой фазы в колонке постепенно уменьшалось, времена удерживания также уменьшались, а на начальном участке колонки появлялись непокрытые неподвижной фазой центры адсорбции, вызывавшие искажение формы пиков. С этим недостатком боролись, насыщая растворитель нанесенной неподвижной фазой еще до его поступления в колонку.

Логическим решением этой проблемы оказалась прививка химическими связями молекул неподвижной жидкой фазы к поверхности твердого носителя таким образом, чтобы ее вымывание стало физически невозможным, т. е. превращение твердого носителя и жидкой фазы в одно целое – в так называемый привито-фазный сорбент. Первые сорбенты такого типа были получены замещением силанольных групп, находящихся на поверхности силикагеля, в результате их реакции со спиртами или аминами. При этом отщеплялась вода, а остатки спиртов или аминов химически связывались с поверхностью силикагеля. Эти так называемые «щеточные» сорбенты позволяли получить высокую эффективность разделения и стабильность времен удерживания при отсутствии вымывания неподвижной фазы из колонки. Однако устойчивость таких сорбентов в условиях применения водных растворителей, а также слабоосновных или кислых сред была низкой: привитая неподвижная фаза отщеплялась химически за счет реакции гидролиза. В дальнейшем усилия исследователей были направлены на поиск реагентов, прививка которых протекала бы достаточно быстро и полно, а образовавшиеся связи были бы максимально устойчивыми. Такими реагентами стали алкилхлорсиланы и их производные, позволившие по сходной технологии получать привито-фазные сорбенты разного типа и с разными, как полярными, так и неполярными группами на поверхности.

Нормально-фазовая распределительная хроматография с привитыми неподвижными фазами. Основными привитыми фазами для нормально-фазовой распределительной хроматографии в настоящее время являются нитрильная и аминная. Каждая из них прививается с использованием соответствующего силана (диметиламинопропилхлорсилана или диметилцианопропилхлорсилана). Нитрильная и аминная привитые неподвижные фазы могут быть использованы в двух вариантах: для нормально-фазовой (с неполярными элюентами) и для обращенно-фазовой (с полярными элюентами) распределительной ВЭЖХ.

В условиях нормально-фазовой хроматографии такие сорбенты работают подобно силикагелю или оксиду алюминия, с теми же элюотропными рядами растворителей и сходными (но не идентичными) порядками элюирования соединений разных классов. За счет разной химической природы силанольных, аминных и нитрильных групп нередко возникают различия в селективности разделения, позволяющие отдать предпочтение тому или иному сорбенту.

Основными преимуществами сорбентов с привитыми нитрильными или аминными группами по сравнению с минеральными адсорбентами являются следующие: (1) вследствие отсутствия силанольных групп вероятность необратимой адсорбции веществ заметно уменьшается; (2) заметно снижается влияние следов воды в подвижной

фазе на хроматографическое разделение, отпадает необходимость строго контролировать содержание воды в растворителях; (3) быстро достигается равновесие с новым составом растворителя, что позволяет быстро переходить от одной методики к другой, а также успешно использовать градиентное элюирование; (4) возможно использовать растворители в широком диапазоне их полярностей; (5) облегчается регенерация колонок; (6) сорбенты с привитыми аминогруппами проявляют свойства слабых анионообменников.

Следует принимать во внимание и некоторые особенности применения сорбентов с привитыми аминными неподвижными фазами. Не рекомендуется использовать в качестве растворителей вещества с альдегидными или кетонными группами, так как в этом случае возможно разрушение структуры привитой фазы с образованием оснований Шиффа. Наличие таких соединений в составе изучаемых проб может приводить к исчезновению некоторых из их компонентов. Аминные неподвижные фазы легко окисляются. Поэтому следует исключить действие на сорбент сильных окислителей. Аналогично при использовании нитрильной привитой неподвижной фазы следует учитывать возможность реакций с нитрилами выбранного растворителя или компонентов, входящих в состав анализируемых проб.

Нитрильные и аминные неподвижные фазы применяют в биологии, медицине, биохимии, фармации и др. (рис. 6.7–6.9). Эти неподвижные фазы нашли наиболее широкое

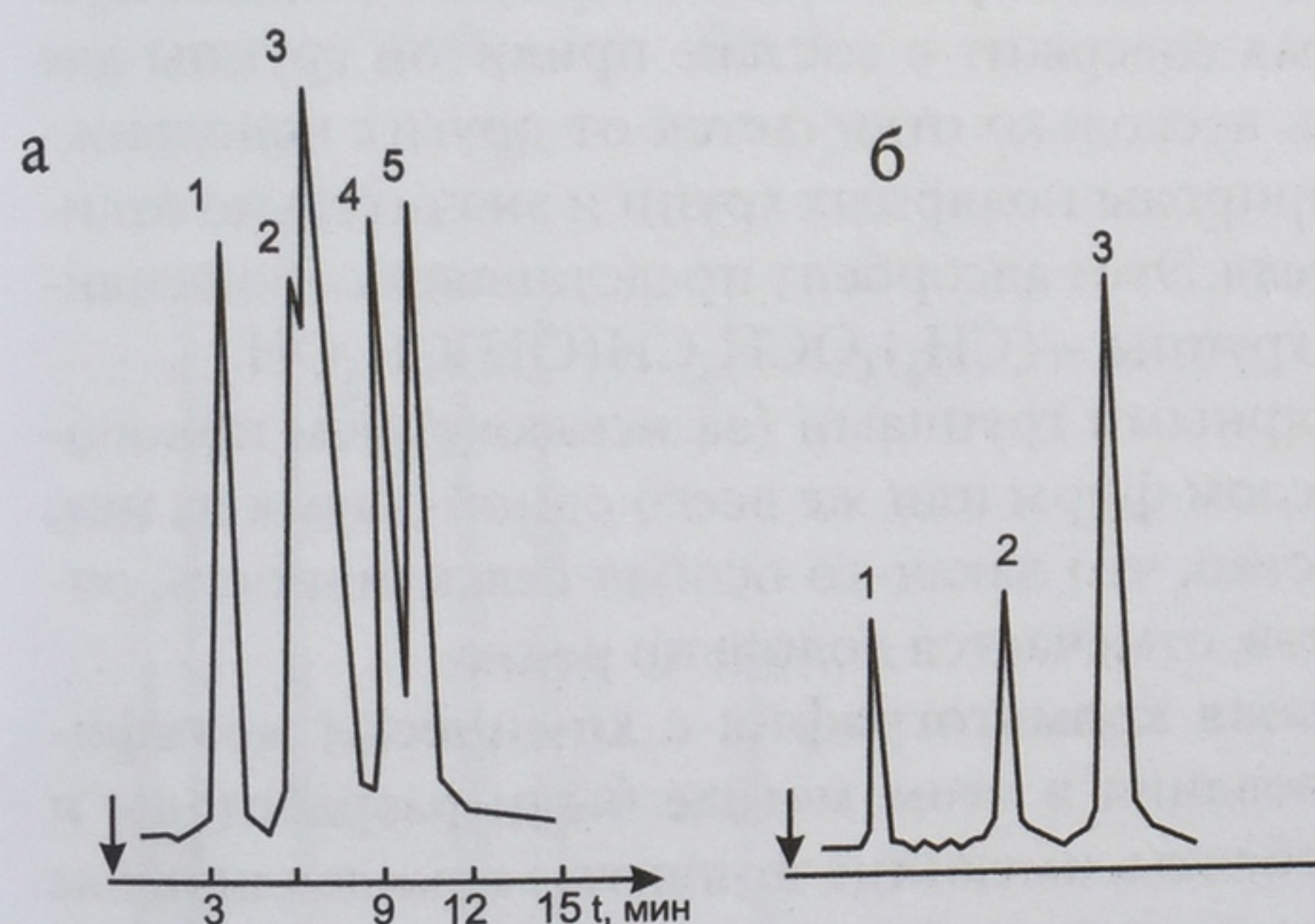


Рис. 6.8. Хроматограммы экстрактов мочи добровольца, отобранной через 2 ч после приема 100 мг эфедрона (а) и через 36 ч (б): 1 — фоновые компоненты мочи; 2 — эфедрин; 3 — псевдоэфедрин; 4 — эфедрон; 5 — амфетамин — внутренний стандарт с концентрацией 20 мкг/мл. Хроматограф «Милихром»; УФ-детектор с длиной волны 210 нм, объем пробы 2 мкл

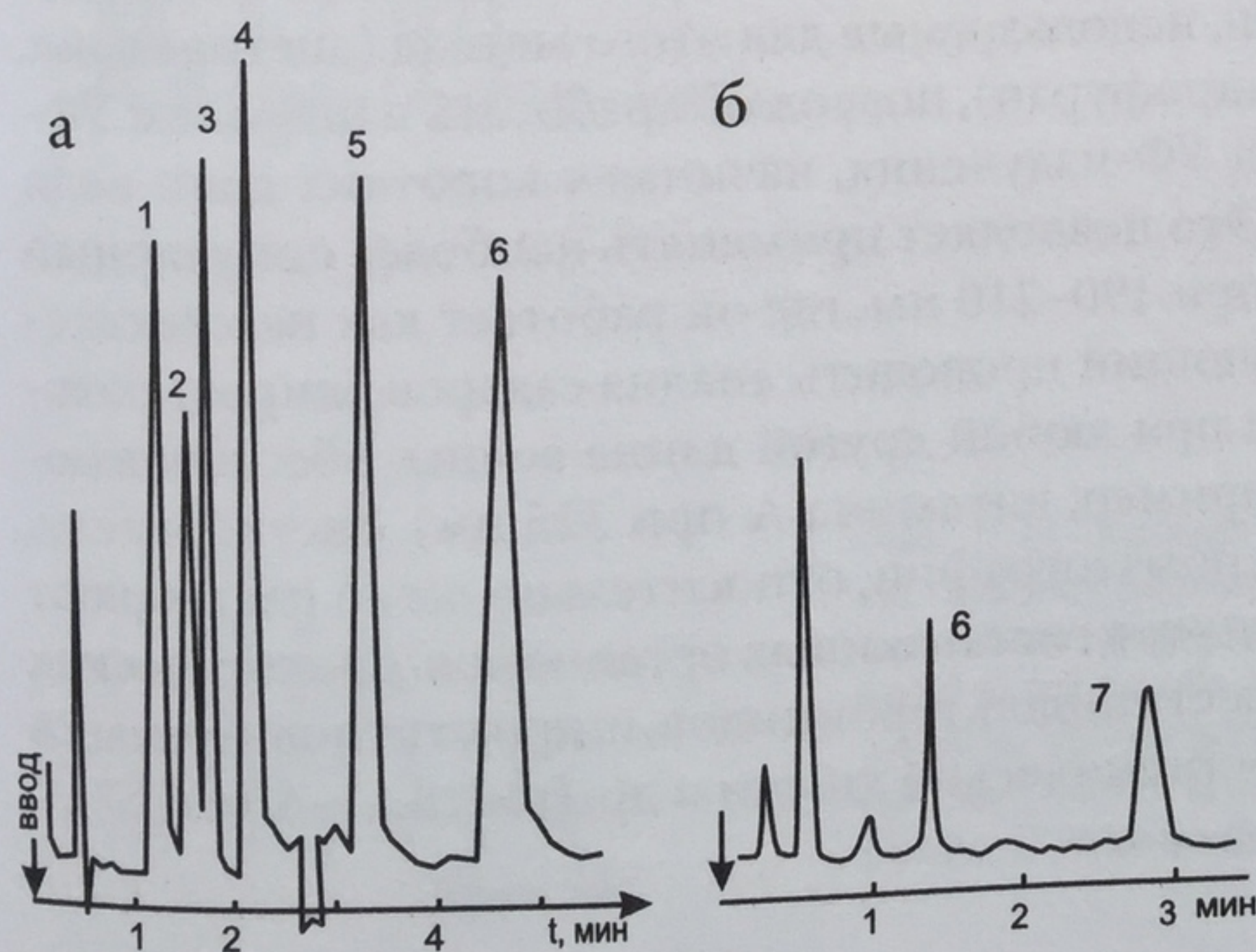


Рис. 6.9. Хроматограммы смеси 1,4-бензодиазепинов (а) и экстракта содержимого кишечника больного, принявшего лекарства этой группы (б): 1 — гидазепам; 2 — оксазепам; 3 — нитразепам; 4 — хлордiazепоксид; 5 — феназепам; 6 — диазепам; 7 — медазепам. Прочие пики — неидентифицированные примеси. Хроматограф «Милихром», условия эксперимента — как на рис. 6.7

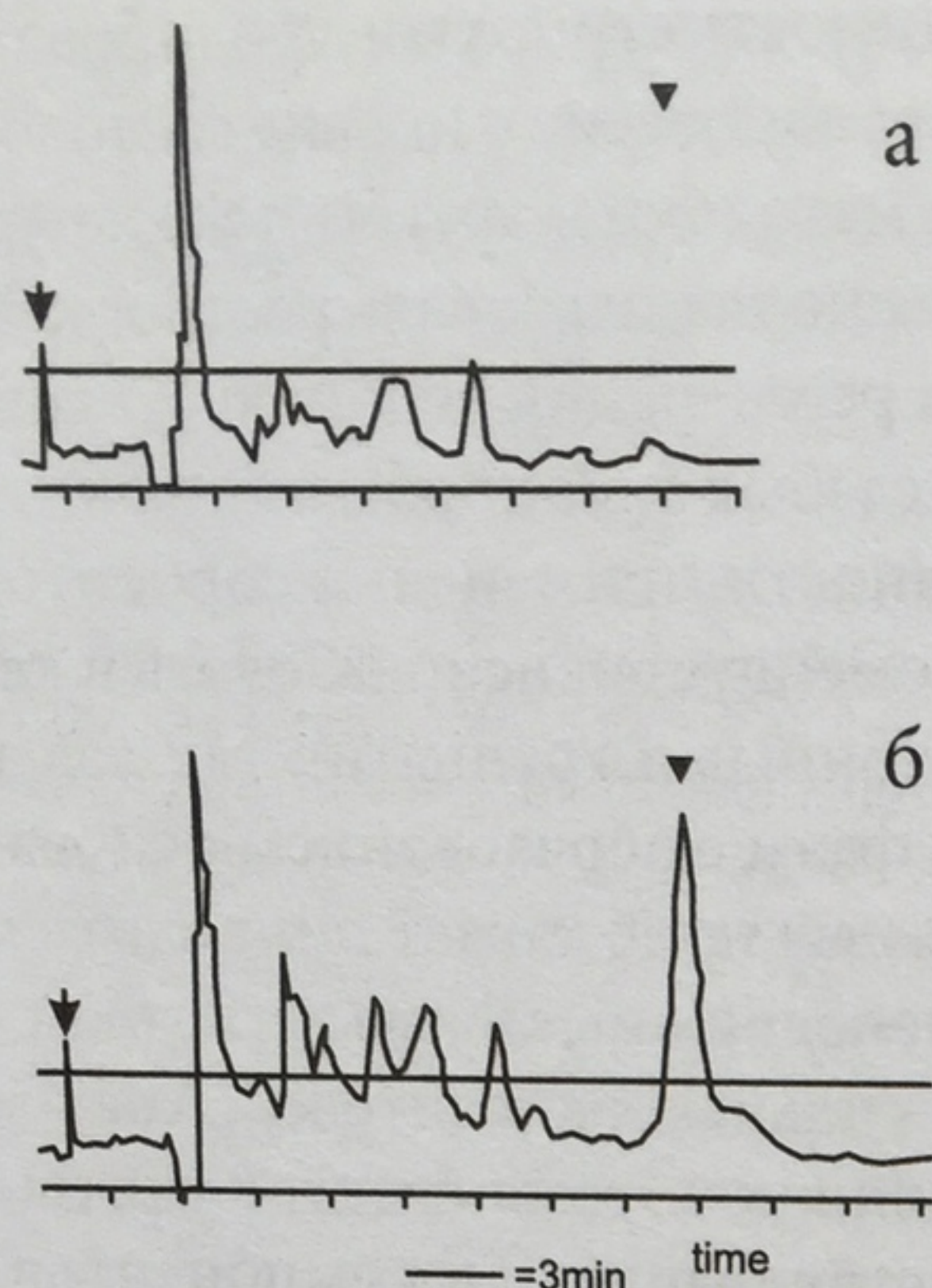


Рис. 6.10. Экстракты пробы волос (25 мг) пациента, не употреблявшего кокаин (а) и употреблявшего кокаин (б). Объем проб 100 мкл, что для пробы б соответствует 1 нг кокаина. Время удерживания кокаина отмечено треугольником [51]

ризнание и выпускаются почти всеми производителями сорбентов. Некоторые фирмы выпускают варианты аминных неподвижных фаз, содержащие, например, диэтиламиноэтильные или диметиламинопропильные группы.

Достаточно широко применяют также еще одну привитую полярную неподвижную фазу – так называемую диольную, которая содержит в составе привитой группы две гидроксильные группы. Ее селективность несколько отличается от других неподвижных фаз вследствие другой химической природы полярных групп и значительно отличается от немодифицированного силикагеля. Этот адсорбент представляет собой силикагель, к поверхности которого привиты группы – $(\text{CH}_2)_3\text{OSi}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH})$.

Сорбенты с другими привитыми полярными группами (за исключением ионообменников) выпускаются лишь малым числом фирм или же всего одной-двумя из них. Причиной этого является то обстоятельство, что какая-то особая селективность, оправдывающая применение таких сорбентов, отмечается довольно редко.

Обращенно-фазовая распределительная хроматография с химически модифицированными сорбентами. Для использования в этом методе были разработаны и получили известное распространение сорбенты, имеющие привитые алкилсилильные группы разной длины (от C_2 до C_{22} с прямой алкильной цепью, а также с фенильной и дифенильной группами). Растворители, используемые для этого метода (ацетонитрил, метанол, вода, в меньшей мере тетрагидрофуран), позволяют работать в широком УФ-диапазоне, так как они прозрачны для УФ-излучения, начиная с коротких длин волн порядка 190–210 нм (ТГФ – с 220 нм). Это позволяет применять наиболее популярный детектор – УФ-спектрофотометр как при 190–210 нм, где он работает как неселективный универсальный детектор, позволяющий проводить анализ сахаров, жиров, сложных эфиров, спиртов, олефинов, так и при любой другой длине волны, обеспечивающей селективное детектирование (например, витамина А при 325 нм). Растворители, используемые в обращенно-фазовой хроматографии, относительно легко растворяют все важнейшие группы веществ, входящих в состав живых организмов, биологических объектов, лекарственных препаратов, пестицидов, гербицидов, широко используемых в органической химии, нефтехимии, биоорганической химии и др. (рис. 6.11–6.14) [57].

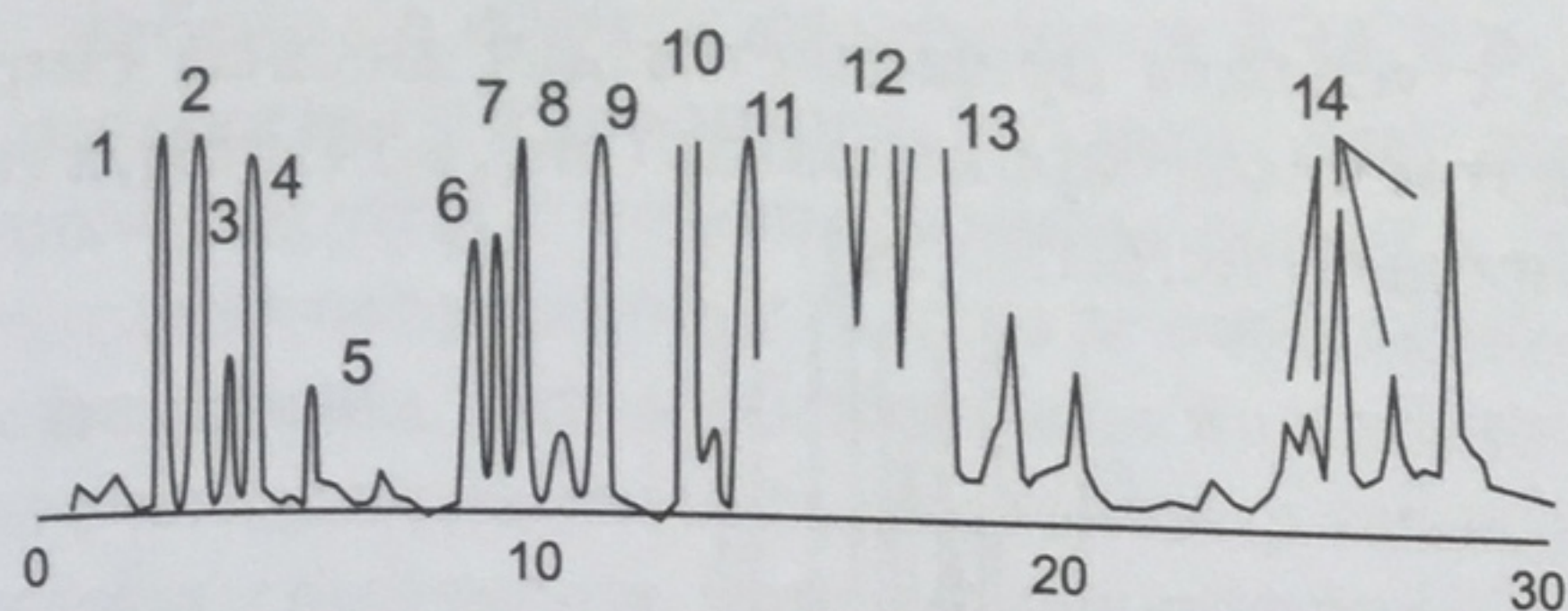


Рис. 6.11. Хроматограмма пробы хлоргидрата кокаина (УФ-детектирование при 215 нм): 1 – меконин (внутренний стандарт); 2 – бензойная кислота; 3 – цис-коричная кислота; 4 – α-труксилловая кислота; 5 – транс-коричная кислота; 6 – ε-труксилловая кислота; 7 – β-труксилловая кислота; 8 – δ-труксилловая кислота; 9 – n-бутирофенон (внутренний стандарт); 10 – бензоилэкгонин; 11 – кокаин; 12 – цис-циннамоилкокаин; 13 – транс-циннамоилкокаин; 14 – изомерные труксиллины.

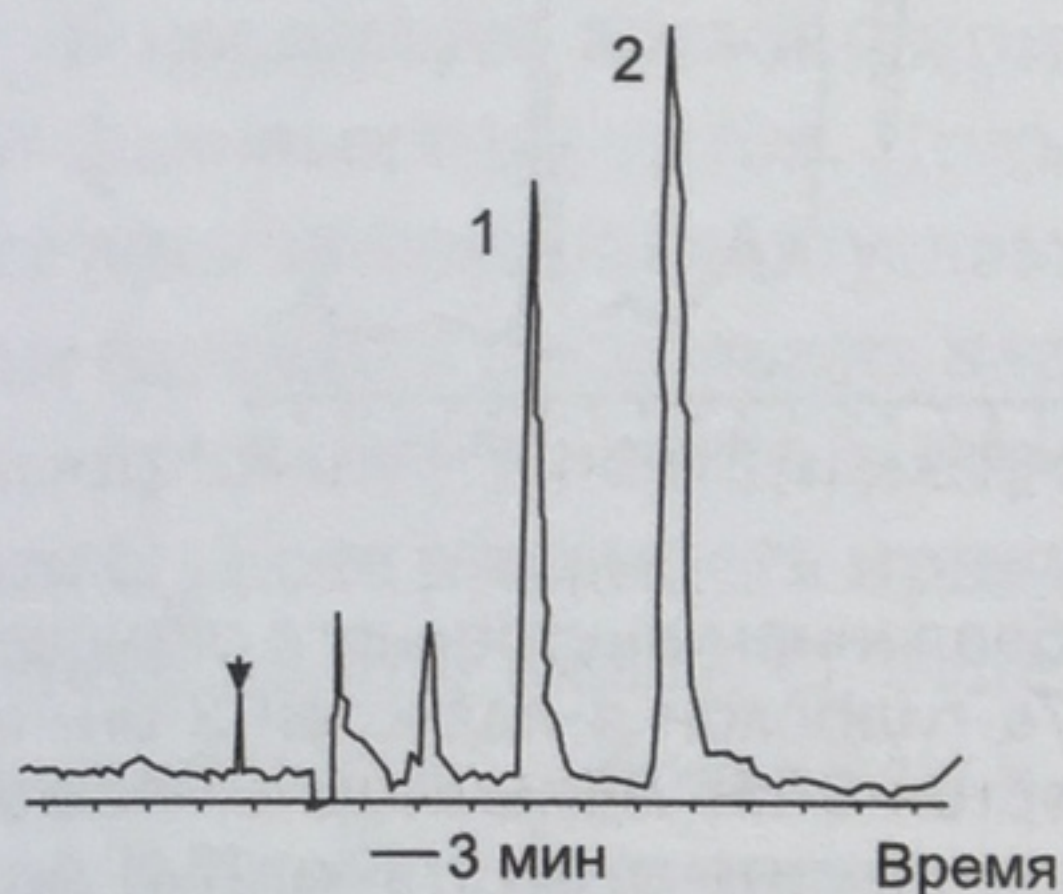


Рис. 6.12. Хроматограмма пробы частично разложившейся трупной крови субъекта, умершего вследствие передозировки наркотика. Содержание кокаина в анализируемой пробе – 1200 нг/мл. Важно отметить присутствие в пробе кокаина (пик 2) и бензоилэкгонина (пик 1) [52]

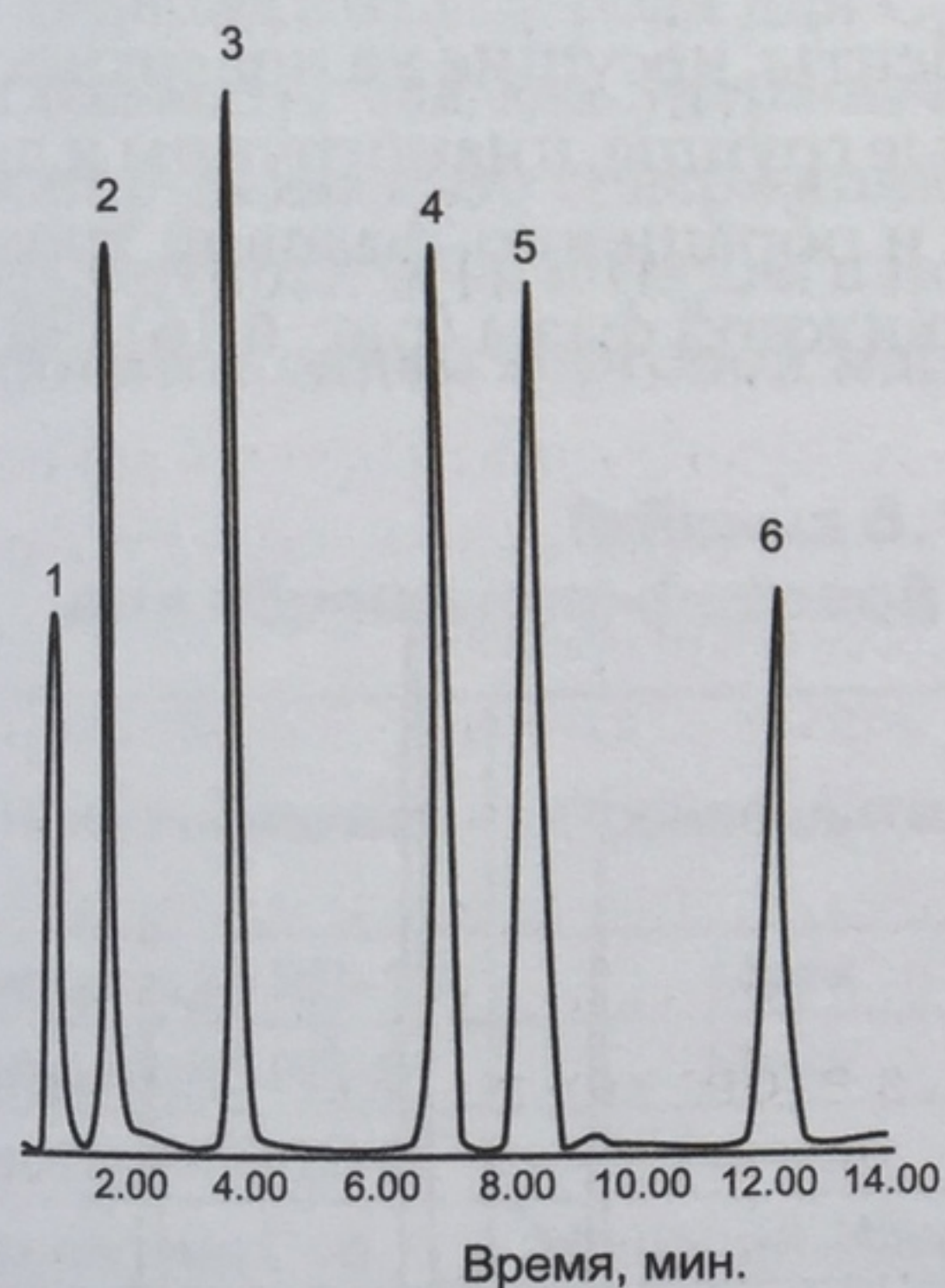


Рис. 6.13. Хроматограмма смеси антигипертензивных лекарств: 1 – атенолол; 2 – амлодипин; 3 – нифедипин; 4 – амтодипин; 5 – нимодипин; 6 – фелодипин; [53]

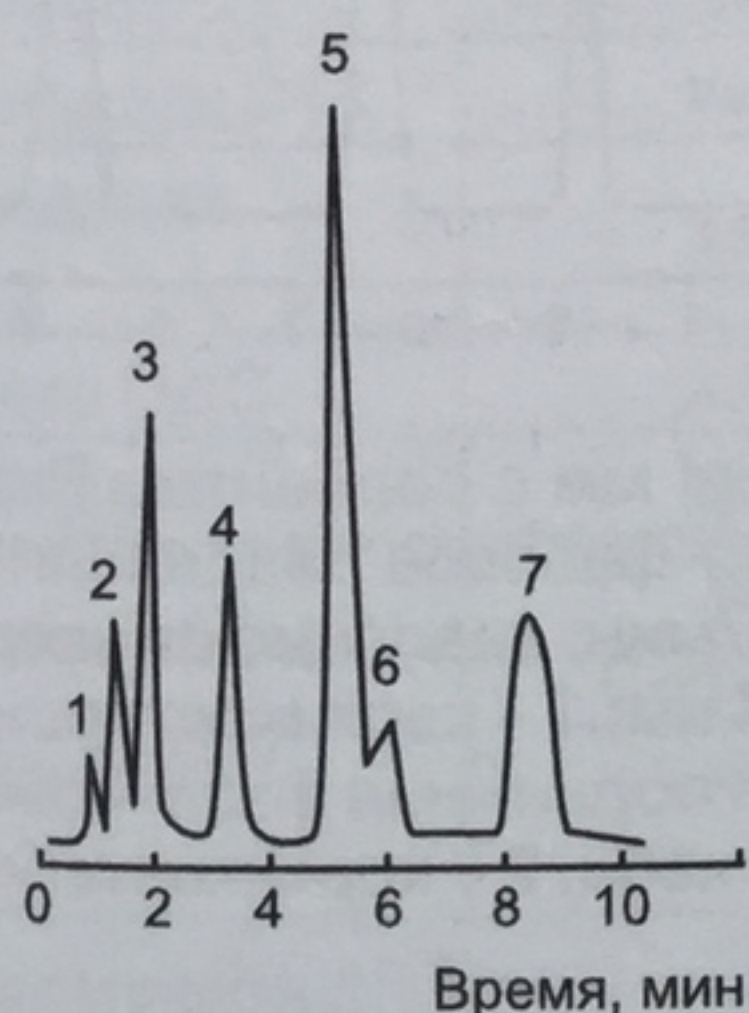


Рис. 6.14. Хроматограмма смеси барбитуратов, полученная на колонке размером 250×4 мм с сорбентом Нуклеосил С18 с величиной зерна 10 мкм. Подвижная фаза – смесь метанол-вода (11:9 по объему). Расход 3.5 мл/мин, давление на входе 14 МПа, УФ-детектирование на длине волны 254 нм; величина пробы 5 мкл: 1 и 6 – неидентифицированные примеси; 2 – веронал; 3 – люминал; 4 – проминал; 5 – ревонал; 7 – тиогенал

Обращенно-фазовая хроматография с успехом применяется для анализа смесей различных лекарственных препаратов, в том числе барбитуратов (рис. 6.14) [49], а также стероидных гормонов различной природы (рис. 6.15) [54].

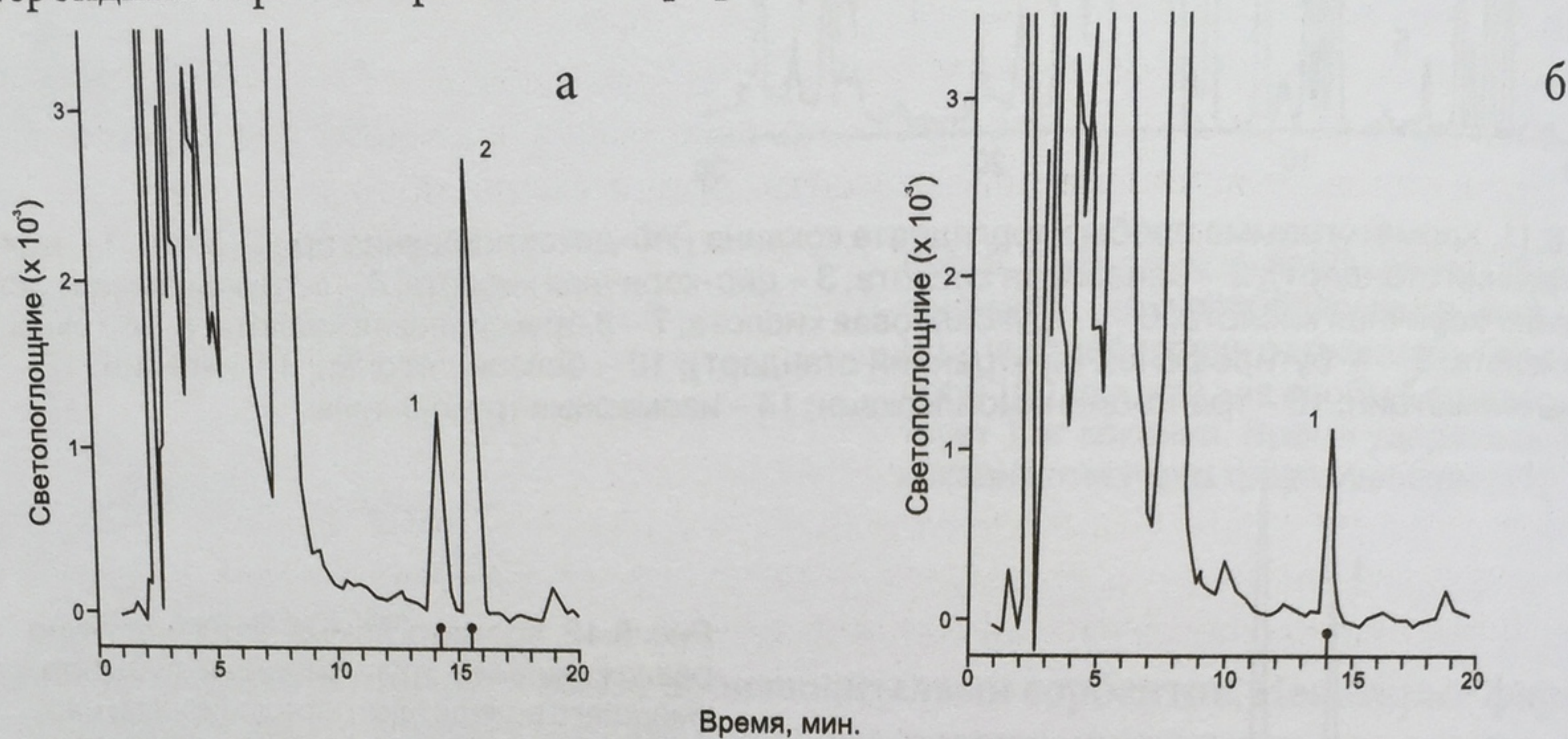


Рис. 6.15. Хроматограммы экстракта сыворотки крови (2 мл) с добавлением внутреннего стандарта 7β -гидрокси-4-холестен-3-она (а) и без такой добавки (б): пик 1- 7α -гидрокси-4-холестен-3-он- эндогенный компонент сыворотки крови; пик 2 – 7β -гидрокси-4-холестен-3-он. Легко видеть, что в области времени удерживания внутреннего стандарта эндогенные компоненты отсутствуют [54]

Интересно отметить, что некоторые привитые адсорбенты, несущие на поверхности органические радикалы с полярными группами (диольные группы, цианогруппы и др.), могут работать как в условиях нормально-фазовой, так и обращенно-фазовой хроматографии в зависимости от характера применяемой подвижной фазы (рис. 6.16) [30].

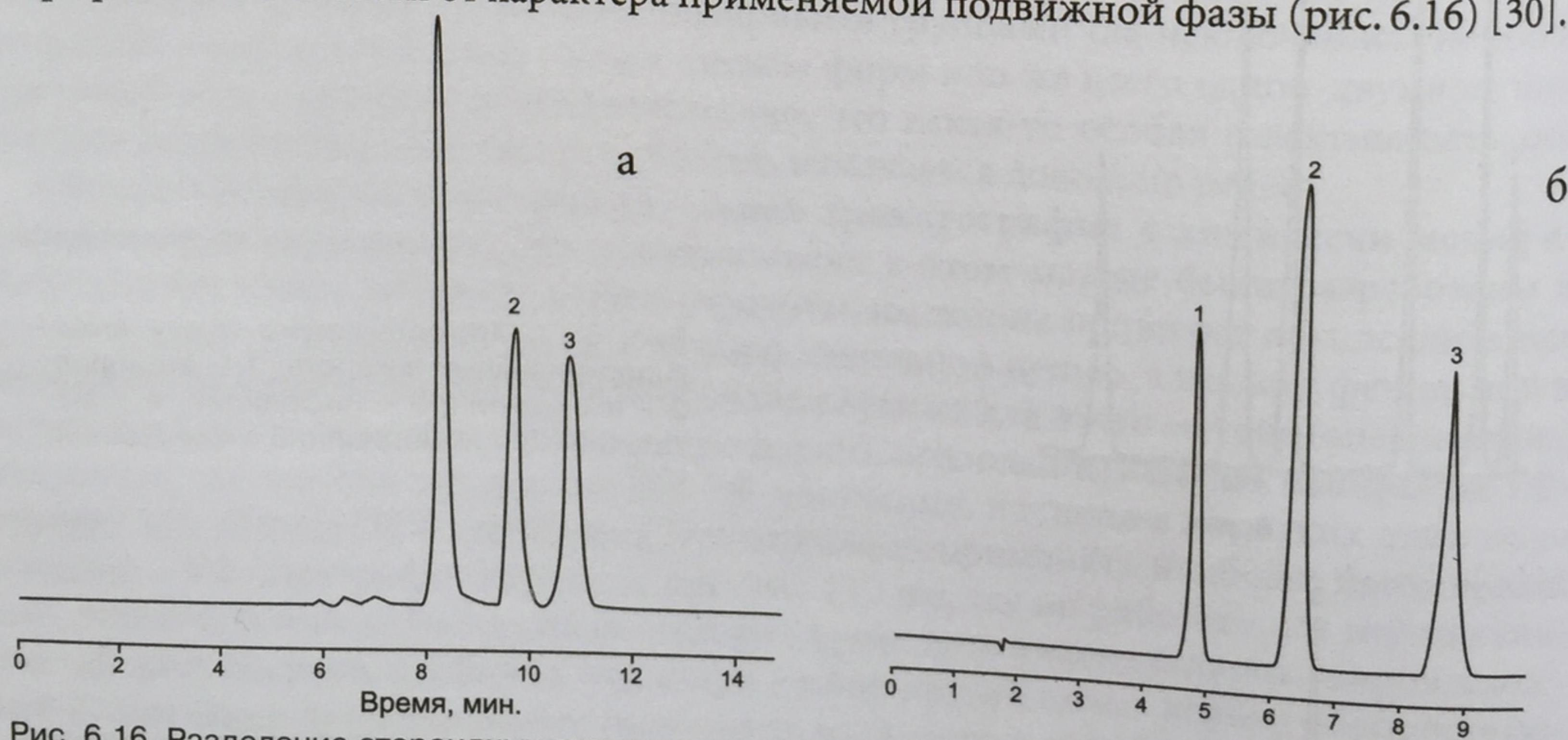


Рис. 6.16. Разделение стероидных гормонов на колонке размером 150×4 мм с сорбентом Pinnacle II Суано с размером частиц 5 мкм (фирма «Рестек», США). (а) Нормально-фазовое разделение. Подвижная фаза смесь гексан-этанол (9:1 по объему), скорость потока 1 мл/мин; давление на входе в колонку 2.9 МПа; величина пробы 10 мкл; УФ-детектор с длиной волны 254 нм: 1 – кортикостерон; 2 – кортизон ацетат; 3 – кортизон; (б) обращенно-фазовое разделение: подвижная фаза – смесь вода-метанол; величина пробы 5 мкл; прочие условия те же (13:7): 1 – кортизон; 2 – кортикостерон; 3 – кортизон ацетат [55].

Сорбенты в обращенно-фазовой ВЭЖХ быстро приходят в равновесие при изменении состава растворителя, что позволяет достаточно легко переходить от одной методики к другой с использованием одной и той же колонки, а также применять градиентное элюирование с быстрым восстановлением равновесия сорбента с исходным растворителем. Эти сорбенты дают возможность использовать растворители в широком диапазоне изменения их свойств, а также применять добавки разных типов (соли, кислоты и основания, ион-парные реагенты, органические модификаторы и т.п.). Регенерация растворителей высокой чистоты может быть осуществлена с использованием ректификации, а загрязненный сорбент в колонке может быть промыт и снова приведен в рабочее состояние при прокачивании через колонку растворителей, удаляющих загрязнения.

В настоящее время фирмы-производители выпускают более 100 разных обращенно-фазовых сорбентов. Примеры некоторых из них приведены в табл. 6.1. Практически все производители выпускают их с привитыми неподвижными фазами C_8 и C_{18} (последние нередко в нескольких вариантах), многие – C_1 – C_3 , (что нередко обозначает одно и то же – прививку триметилхлорсилана или диметилдихлорсилана), некоторые – фенил, C_4 или C_6 . Если плотность прививки неподвижной фазы одинакова, то сорбент с привитой неподвижной фазой C_4 будет содержать в 2 раза меньше, а для адсорбента с привитыми группами C_{18} более чем в 2 раза больше привитого углерода, чем в случае неподвижной фазы C_8 . На практике эта плотность несколько падает в ряду $C_4 > C_8 > C_{18}$, поэтому содержание углерода для C_4 несколько больше, а для C_{18} – меньше, чем можно было бы ожидать. Так как удерживание соединений в обращенно-фазовой хроматографии пропорционально содержанию привитого углерода (точнее, той части привитого углерода, которая доступна для взаимодействия с молекулами разделяемых веществ), то для сорбентов одной торговой марки удерживание увеличивается в ряду $C_2 < C_4 < C_8 < C_{18}$.

Таблица 6.1. Свойства некоторых адсорбентов для обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии

Наименование	Производитель	Форма частиц*	Величина частиц, мкм	Диаметр пор, нм	Удельная поверхность, м ² /г	Примечания
Лихросорб РП-18	Мерк	Нпр	5, 7, 10	10	300	22% С
Лихросорб РП-8	Мерк	Нпр	5, 7, 10	10	300	14% С
Партисил ОДС-3	Ватман	Нпр	5, 10	5	400	10% С
Нуклеосил С18	Машерай-Нагель	Сф	3, 5, 7, 10	10	300	
Нуклеосил С8	Машерай-Нагель	Сф	5, 7, 10	10	300	
μ-Бондапак С18	Уотерс	Нпр	10	–	300	10% С
μ-Бондапак Фенил	Уотерс	Нпр	10	–	300	16% С
Зорбакс ОДС	Дюпон	Сф	8	7	350	22% С
Зорбакс С8	Дюпон	Сф	8	7	350	15% С
Сферисорб ОДС	Фэйз Сепаратион	Сф	5, 10	8	220	6% С
Сферисорб ОДС-2	Фэйз Сепаратион	Сф	5, 10	8	220	12% С

Примечание: * Нпр – неправильная, Сф – сферическая

Однако, если взять сорбенты разных производителей, то нередко сорбент с неподвижной фазой C_8 может удерживать разделяемые вещества не слабее, а сильнее, чем сорбент с неподвижной фазой C_{18} , выпускаемый другой фирмой.

В качестве растворителей для обращенно-фазовой ВЭЖХ используют преимущественно метанол и ацетонитрил. Другие спирты, кроме метанола, используют редко, так как их вязкость значительно выше и при работе с ними требуется слишком большое давление, тогда как эффективность разделения падает вследствие затрудненной диффузии в подвижной фазе. Тетрагидрофуран также используют значительно реже, во-первых, из-за его нестабильности при хранении (он быстро окисляется, накапливая гидропероксиды, которые уменьшают УФ-диапазон пропускания, способны окислять привитую неподвижную фазу и взрывоопасны), во-вторых, из-за трудности очистки перегонкой (необходимо разрушать пероксиды до перегонки во избежание взрыва). Ацетонитрил имеет ряд преимуществ перед метанолом. При хорошей очистке он лучше пропускает в ультрафиолетовом диапазоне (ниже 210 нм) и позволяет работать в смеси вода-ацетонитрил при 200 и даже при 190 нм. Он обычно обладает лучшими растворяющими свойствами для проб, чем метанол. При использовании смесей метанол-вода и ацетонитрил-вода вязкость смесей не является аддитивной величиной и при 25°С меняется от 0,89 и 0,57 МПа·сек (для чистой воды и метанола, соответственно) до 1,4 (для смеси ацетонитрил-вода, соответствующие величины равны 0,89, 0,43 и 0,98 МПа·сек). Большая вязкость смесей метанол-вода по сравнению со смесями ацетонитрил-вода (почти в 1,5 раза) затрудняет использование колонок, заполненных частями сорбентов размером 3 и 5 мкм, при использовании водно-метанольных смесей. Точно так же колонки, работающие с системой метанол-вода, при градиентном элюировании подвергаются при равном расходе действию больших давлений и быстрее выходят из строя. Наконец, важную роль играет и то обстоятельство, что метанол относится к группе особо опасных ядов, находящихся на строгом контроле и учете, тогда как ацетонитрил к этой группе веществ не относится. Недостатками ацетонитрила, несколько ограничивающими его использование, являются его довольно высокая стоимость (особенно высокочистых сортов, предназначенных для ВЭЖХ и УФ-спектроскопии), некоторая токсичность, требующая предосторожностей при работе, а также то, что его труднее, чем метанол, освободить от воды, так как он образует с ней азеотропную смесь. Это затрудняет его регенерацию из отработанного растворителя, что особенно важно при большом масштабе проводимых исследований, например, при preparative работе.

Особо следует сказать о качестве воды и о требованиях к ней. Вода, являющаяся в настоящее время одним из важнейших растворителей для ВЭЖХ, является как самым доступным, так и очень трудным для тщательной очистки растворителем. Если для изократических разделений, особенно при использовании не очень чувствительных детекторов или при работе не в ближнем УФ-диапазоне, удастся обойтись бидистиллятом (не деионизированной водой!), то для градиентных разделений и для работы с высокочувствительными детекторами такого качества воды уже недостаточно. Деионизированная вода, как правило, не подходит для использования в ВЭЖХ: органические иониты, используемые для извлечения из нее неорганических ионов, дают воду с очень низкой проводимостью, однако содержащую заметные количества органических загрязнений по сравнению с водой до деионизации. Удалить все органические соединения из воды очень трудно, особенно микроколичества – никакая перегонка или ректи-

фикация не помогают, так как вследствие образования азеотропных смесей отделить примеси органических соединений полностью не удастся.

Существуют системы высокой очистки воды, осуществляющие деионизацию с последующим извлечением органических соединений адсорбентами, однако они достаточно дороги. Разработаны системы, позволяющие резко уменьшить содержание органических соединений в воде путем обработки ее мощным УФ-облучением, иногда с последующей обработкой адсорбентами. Эти системы дешевле, но не так универсальны. Наконец, существуют патроны, заполненные адсорбентом, рассчитанным на извлечение органических соединений из определенного объема воды (обычно из 15 л) – они достаточно недороги и удобны, позволяют получить ровно столько очищенной воды, сколько нужно для ближайшей работы. Высокочистая вода нестабильна при хранении, поэтому лучше ее использовать достаточно быстро и свежеприготовленную.

В том случае, если таких систем или патронов в распоряжении исследователя нет, следует взять наиболее чистую воду, имеющуюся в лаборатории и пропустить ее через колонку, заполненную чистым обращенно-фазовым сорбентом с привитой неподвижной фазой C_{18} . Все органические примеси из воды будут сорбироваться в начале колонки, а на выходе колонки будет получаться чистая вода без примесей. После пропускания определенного объема воды, зависящего от количества органических загрязнений в ней, эту колонку промывают чистым метанолом или ацетонитрилом, смывая загрязнения, после чего она снова будет готова к работе.

Возможны разные варианты такой очистки. Можно просто при использовании градиента высокого давления установить колонку с привито-фазным сорбентом C_{18} , желательно не обладающую большим гидравлическим сопротивлением (с зернением 20 или 15 мкм), после насоса, подающего чистую воду, до смесителя. В этом случае колонка будет очищать ровно столько воды, сколько нужно для работы, и вода будет свежеччищенная. Можно использовать колонку, заполненную более крупным сорбентом (например, 40-63 мкм), и подавать воду под гидростатическим давлением, получая столько воды, сколько нужно на день работы. Можно, наконец, использовать полупрепаративную или препаративную колонку для ВЭЖХ и качать воду насосом хроматографа, используя для очистки воды ночное время, когда аналитическая работа не проводится. Какой вариант удобнее, должен решить сам исследователь.

6.7. Ионная хроматография

Ионная хроматография является особым видом ионообменной хроматографии, применяемым для анализа органических и неорганических ионов, не поглощающих в УФ-области [57]. В этом методе ионообменное разделение ионов сочетают с их кондуктометрическим или спектрофотометрическим определением. Так как высокочувствительное кондуктометрическое определение возможно только при невысокой фоновой электропроводности потока жидкости, поступающей в детектор, фоновый электролит подвижной фазы предварительно удаляют пропусканием его через ионообменные смолы.

Предложены два основных метода ионной хроматографии.

1. Двухколоночная ионная хроматография, основанная на компенсации (подавлении) электролита, содержащегося в элюенте для разделения смеси ионов, с помощью

второй ионообменной колонки, расположенной между детектором и разделительной колонкой. Этот метод и был изначально назван ионной хроматографией.

Принципиальная схема установки для ионно-хроматографического анализа катионов показана на рис. 6.17.

Вещества разделяются на катионообменной колонке 4 по ионообменному механизму, попадают в так называемую подавительную колонку 5 со смолой в OH^- -форме, где происходит нейтрализация подвижной фазы и удаление электролита из элюента. Анализируемые вещества выходят из колонки 5 в деионизированной воде и детектируются электрокондуктометрическим детектором. Сигнал кондуктометра 6 поступает на самописец или интегратор. Аналогично анализируют анионы, однако в подавительную колонку помещают ионообменник большой емкости в H^+ -форме. Подавительную колонку приходится часто регенерировать, поэтому отношение объема колонки 5 к объему колонки 4, должно быть порядка 10. Предложены различные схемы разделения для ионной хроматографии и разные варианты заполнения разделительной и подавительной колонок.

Существуют два способа детектирования – прямой и косвенный (т.е. по уменьшению электропроводности). В прямом способе элюент переводят в соединение с низкой электропроводностью, а определяемый ион – в высокопроводящее соединение и детектирование проводят по положительным пикам. В косвенном способе, наоборот, элюент переводят в высокопроводящее соединение, а определяемый ион – в низкопроводящее и детектируют по отрицательным пикам (т.е. по уменьшению электропроводности).

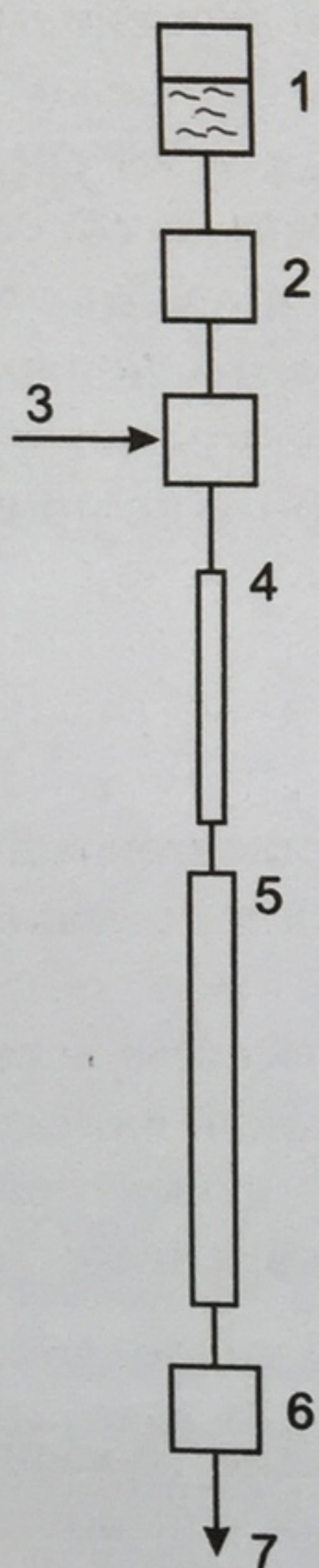


Рис. 6.17. Схема двухколоночной ионно-хроматографической системы: 1 – источник подвижной фазы; 2 – насос; 3 – устройство ввода пробы; 4 – хроматографическая колонка; 5 – подавительная колонка; 6 – электрокондуктометрический детектор; 7 – слив.

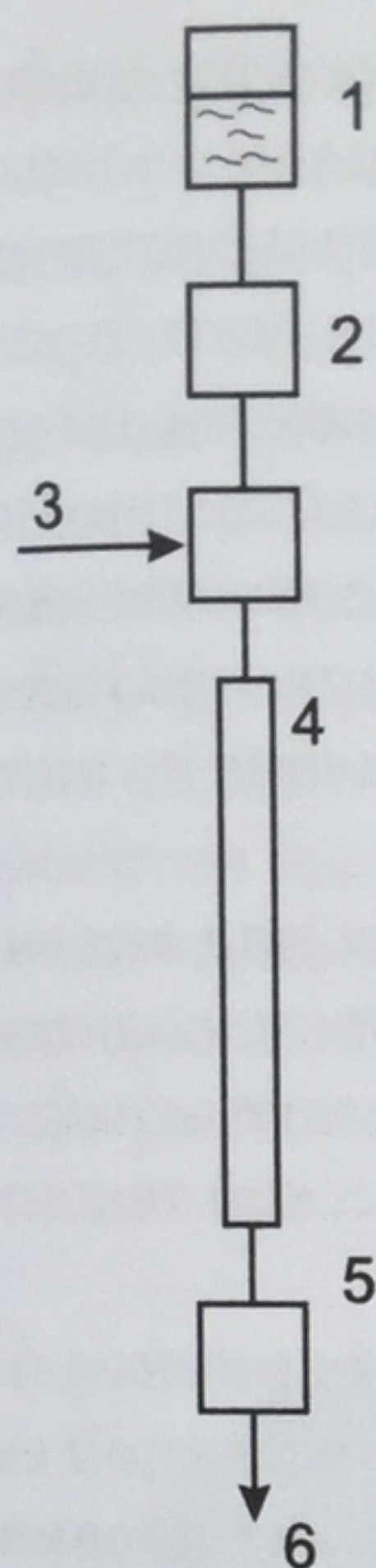


Рис. 6.18. Схема одноколоночной ионно-хроматографической системы: 1 – источник подвижной фазы; 2 – насос; 3 – устройство ввода пробы; 4 – хроматографическая колонка; 5 – электрокондуктометрический детектор; 6 – слив

2. Другим вариантом ионной хроматографии является одноколоночная ионная хроматография, основанная на использовании электролита с невысокой электропроводностью. В этом случае подавительная колонка отсутствует. Одноколоночный вариант ионной хроматографии предложили в 1979 г. Гьерде, Фритц и Шмуклер [57] для определения анионов. В предложенном варианте (рис. 6.18) кондуктометрический детектор был непосредственно соединен с разделяющей колонкой.

Для сохранения высокой чувствительности определения, которая в двухколоночном варианте достигается благодаря использованию системы подавления, в одноколоночном варианте используют элюенты с очень низкой электропроводностью. Это чаще всего анионы ароматических кислот, имеющих низкую эквивалентную электропроводность, но в то же время обладающих высоким сродством к анионообменнику, что позволяет достичь быстрого и селективного разделения определяемых анионов. В качестве элюентов применяют либо растворы солей ароматических кислот с концентрацией $(1-5) \times 10^{-3}$ М, либо растворы самих кислот с такой же концентрацией. Величина рН элюентов изменяется от 3 до 8. Первоначально одноколоночный вариант был предложен для кондуктометрического детектирования, позднее его стали широко использовать с косвенным УФ [58–60] и электрохимическим [62] детектированием.

К преимуществам одноколоночной ионной хроматографии по сравнению с двухколоночной следует отнести его следующие особенности:

- более высокую эффективность разделения, которая достигается за счет уменьшения мертвого объема системы, а также благодаря возможности использовать сорбенты на основе силикагеля;
- простоту аппаратуры;
- отсутствие необходимости периодически регенерировать подавляющую систему;
- возможность использовать различные детекторы;
- менее жесткие требования к химической устойчивости сорбентов и к коррозионной стойкости хроматографической системы;
- более широкий выбор элюентов.

Однако пределы обнаружения ионов в одноколоночной ионной хроматографии обычно выше, чем в двухколоночной. Поэтому при определении очень малых концентраций (менее 0,1 мг/л) предпочтение в большинстве случаев отдается двухколоночному варианту. Использование электрохимического детектора позволяет снизить пределы обнаружения некоторых ионов по сравнению с двухколоночным вариантом, но при этом теряется универсальность определения. Кроме того, недостатком одноколоночного варианта является более узкий по сравнению с двухколоночным диапазон линейности градуировочных характеристик детекторов. Сравнительно узкий интервал pH (3–8) элюентов для одноколоночного определения позволяет проводить разделение на ионообменниках как на полимерной основе, так и на основе силикагеля.

В настоящее время метод ионной хроматографии мало используется для анализа наркотических средств, хотя многие из них, будучи по своей природе производными аминов, легко ионизируются и могут разделяться в режиме ионной хроматографии. Обширные возможности этого плодотворного варианта хроматографической техники иллюстрируют рис. 6.19 и 6.20.

Большое распространение в одноколоночной ионной хроматографии анионов получили адсорбенты на основе силикагеля с размером частиц 6–10 мкм и обменной емкостью 0,1–0,3 ммоль экв/г. Элюирование на этих адсорбентах проводят, как правило, растворами фталевой, бензойной, салициловой кислот или их солей. Анионообменники

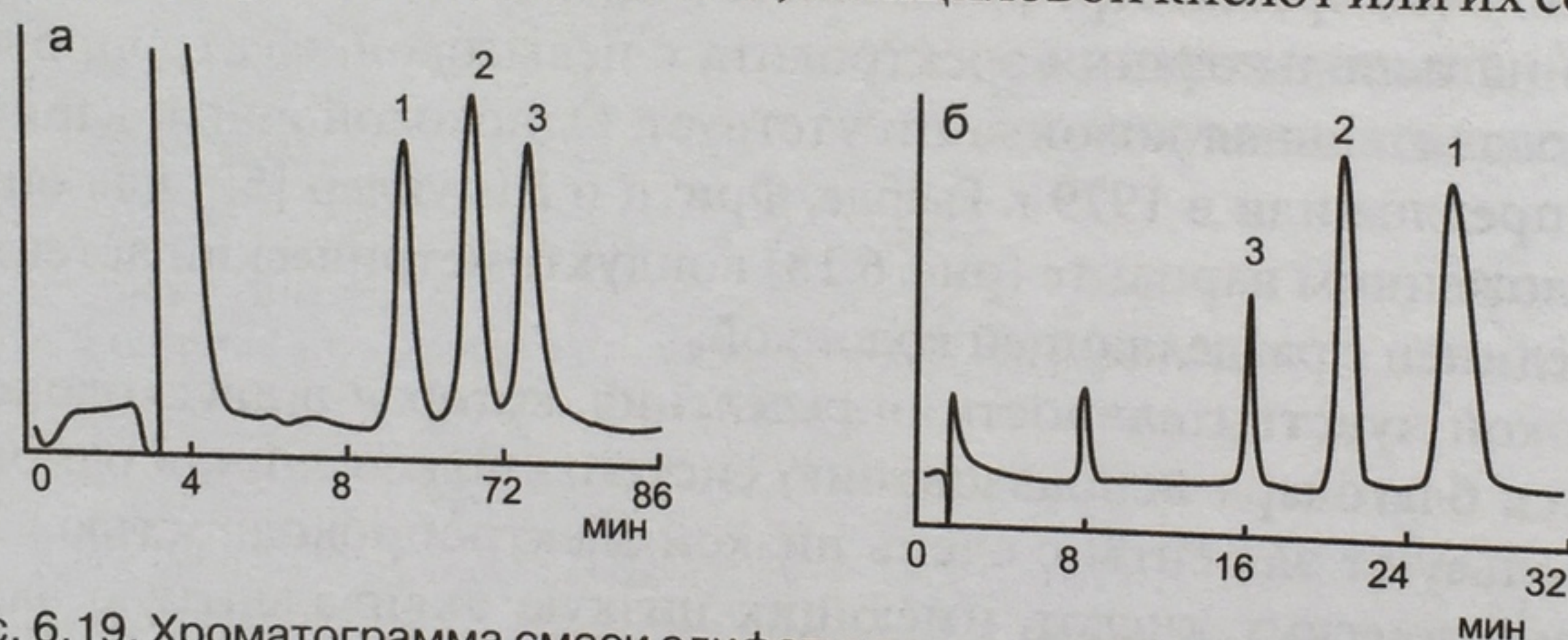


Рис. 6.19. Хроматограмма смеси алифатических аминов.

Колонка размером 250×4.6 мм с сорбентом DionexHPLC-CS2; (а) элюент – раствор хлорида бензилтриметиламмония: концентрация 7.5 мМ, скорость потока 0.5 мл/мин, косвенное УФ-детектирование, длина волны 275 нм; (б) элюент HCl, концентрация 10 мМ, скорость потока 1.0 мл/мин, электрокондуктометрическое детектирование: 1 – метиламин; 2 – диметиламин; 3 – триметиламин

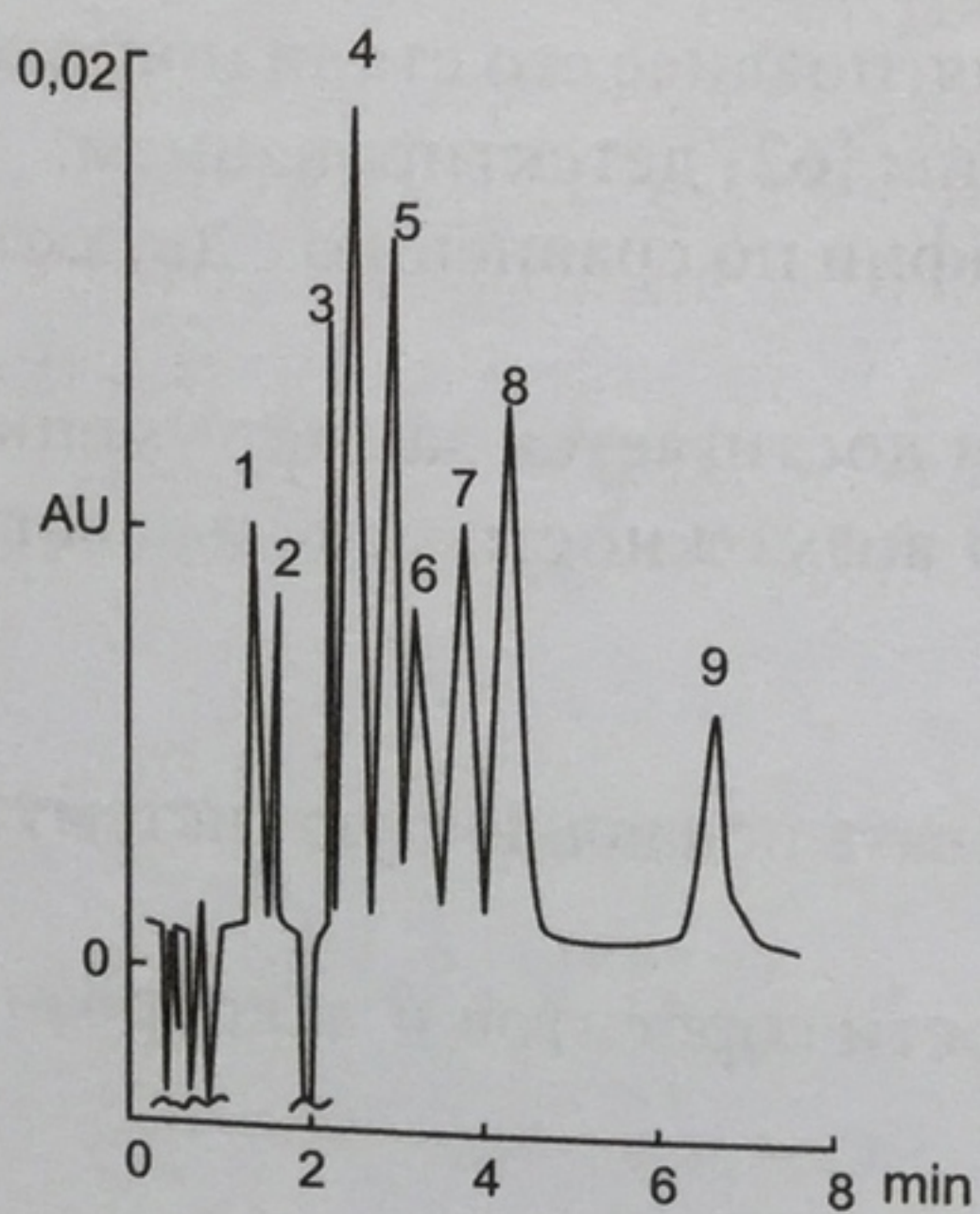


Рис. 6.20. Хроматограмма смеси, содержащей ионы переходных металлов, полученная с помощью ион-парной хроматографии. Колонка размером 100×3 мм, заполненная сорбентом Силасорб С18; элюент – раствор 5 мМ оксалата натрия, 3 мМ пиридиндикарбоновой кислоты и 1 мМ гидроксида тетрабутиламмония (pH 5.5); скорость элюента 0,5 мл/мин; УФ-детектирование при 254 нм. Обозначение пиков: 1 – свинец (II); 2 – железо (III); 3 – медь (II); 4 – никель (II); 5 – цинк (II); 6 – кобальт (II); 7 – марганец (II); 8 – кадмий (II); 9 – ртуть (II)

на основе силикагеля характеризуются высокой для ионной хроматографии эффективностью разделения. Так, для адсорбентов фирм Vydac и Wescan (США) эффективность составляет 16 000 т.т./м, а для адсорбента Toyo Soda (Япония) 2500 т.т./м. Требованиям ионной хроматографии удовлетворяют особые поверхностно-пористые (пелликулярные) ионообменники, состоящие из твердого инертного ядра, покрытого тонким слоем ионита. На таких сорбентах быстро устанавливается равновесие, так как диффузия в тонкой ионообменной пленке протекает достаточно быстро. В результате этого хроматографический процесс может быть существенно ускорен. Эти сорбенты обладают очень малой ионообменной емкостью. Синтез и использование поверхностно-слойных сорбентов были изучены за несколько лет до опубликования первых работ по ионной хроматографии, однако именно в этом методе такие сорбенты нашли самое широкое применение. Структура ионообменных сорбентов с малой обменной емкостью представлена схематически на рис. 6.21.

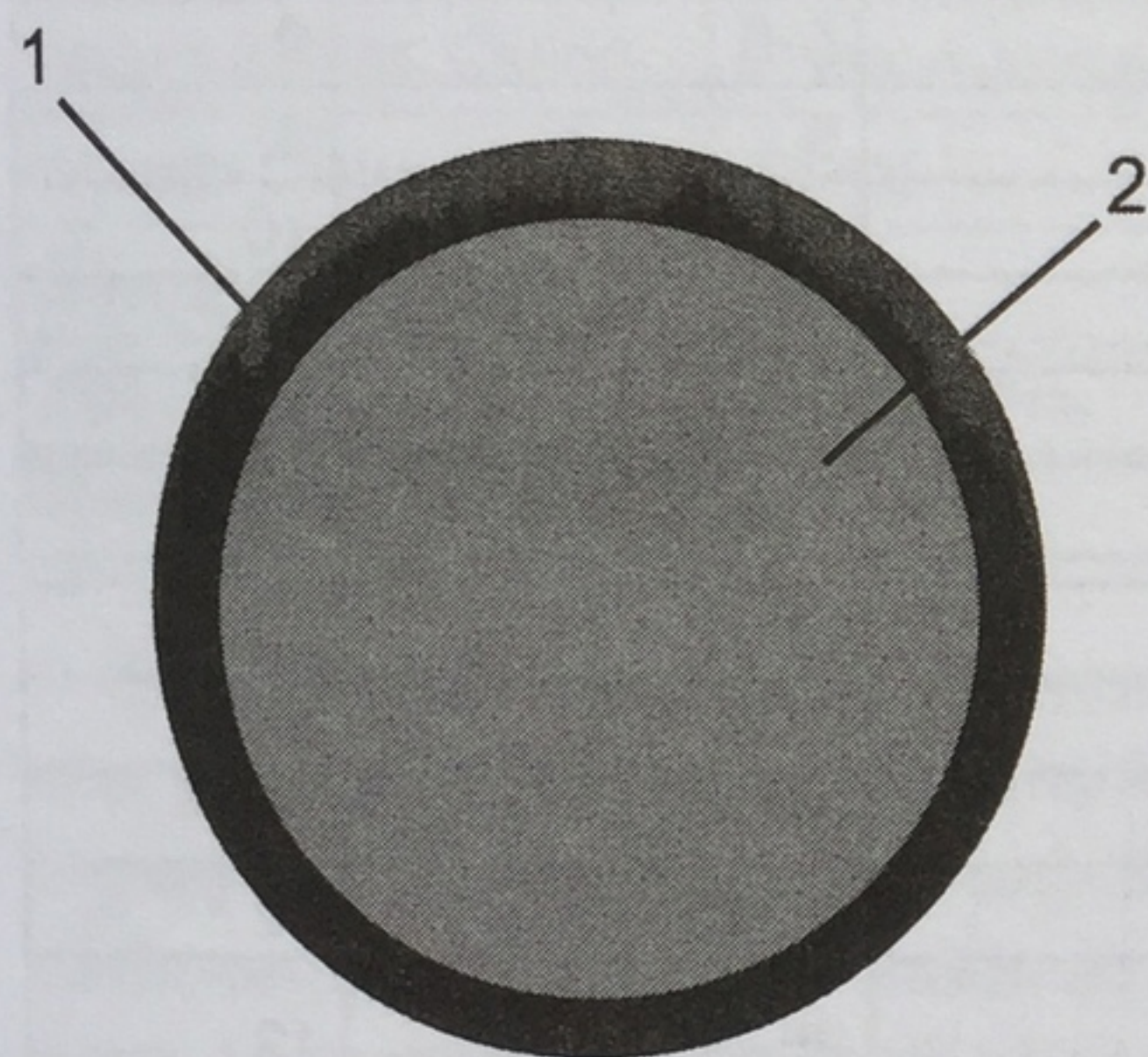


Рис. 6.21. Структура частиц поверхностно-слойного (пелликулярного) сорбента с малой сорбционной емкостью: 1 – сорбционный слой; 2 – сорбционно неактивное и непроницаемое для подвижной фазы ядро.

Анионообменники. Продажные анионообменники, используемые в качестве неподвижной фазы в ионной хроматографии, приведены в табл. 6.2. Наиболее распространенными анионообменниками на полимерной основе являются сорбенты фирмы Дайонекс (США). Ядро этих сорбентов представляет собой сополимер стирола и дивинилбензола. Его поверхность вначале сульфатируют, а затем полученный поверхностно сульфированный канионит обрабатывают очень мелкими частицами (0,1–0,5 мкм) анионообменного латекса. Под действием электростатических сил частицы латекса притягиваются к поверхности смолы и образуют тонкую оболочку вокруг ядра. Таким образом, получающийся сорбент состоит из трех различных слоев: внутреннего ядра, сульфированного слоя и слоя анионообменных частиц. Преимущество поверхностно-пористых анионообменников перед обычными состоит в резком снижении диффузионного сопротивления, что приводит к ускорению обмена ионов элюента и образца и к значительному увеличению эффективности разделения. Анионообменники на полимерной основе стабильны при высоких значениях pH (более 9).

Таблица 6.2. Анионообменники для ионной хроматографии

Наименование	Основа	Обменная емкость, ммоль экв./г	Размер частиц, мкм	Изготовитель
Biotronik BT I AN	Стирол-дивинилбензол	0,03	10	1
Biotronik BT II AN	То же	0,02	10	1
Dionex Anion	«	0,03	25	2
Dionex HPIC-AS	«	—	15	2
ХИКС	Оксиалкилметакрилат	0,02–0,03	20–25	3
Interaction Ion-100	Гидрофильный полимер	0,1	10	4
Nucleosil 10-SB	Силикагель	1,0	—	5
Partisil 10-SAX	То же	0,01	10	6
PRP-X100	Стирол-дивинилбензол	0,20	10	7
CAB-120	То же	0,05	20–25	8
TSK-GellC AnionPW	Полиметакрилат	0,03	10	9
TSK-GellC AnionSW	Силикагель	0,4	5–8	9
TSK-Gel 620	Поливиниловый полимер	0,03	9	9
Vydac 302 SC	Силикагель	0,1	30–44	10
Vydac 302 IC	То же	0,1	10–20	10
Vydac 301 SB	То же	0,1	30–40	10
Waters IC-PAK Anion	Полиметакрилат	0,03	10	11
Wescan Anion	Силикагель	—	—	12
Wescan Anion/HS	То же	—	—	12
Wescan Anion/R	То же	—	—	12
Wescan Anion/R-HS	То же	—	—	12
Zipax SAX	Силикагель, покрытый полиметакрилатом	0,01	25–30	13

Изготовитель: 1 – Biotronik Wissenschaftliche Geräte GmbH., Maintal, Germany; Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA; 3 – Институт химии Акад. наук Эстонии, Таллинн; 4 – Interaction Chemicals, Mountain View, CA, USA; 5 – Marcherey-Nagel, Düren, Germany; 6 – Whatman, Inc., 7 – Hamilton, Reno, NV, USA; 8 – Институт геохимии и аналитической химии РАН, Москва, Россия; 9 – Toyo Soda Manufacturing Co., Tokyo, Japan; 10 – Separation Group, Hesperia, CA, USA; 11 – Waters, Division of Millipore, Milford, MA, USA; 12 – Wescan Instruments Inc., Santa Clara, CA, USA; 13 – Du Pont de Nemours and Co. Inc., Wilmington, Delaware, USA.

Анионообменный слой на поверхности зерна сорбента может быть закреплен также путем химического взаимодействия соответствующих ионогенных групп с инертным ядром. Такой способ синтеза анионообменников также используется достаточно широко [63, 65]. Инертную основу анионообменников составляют смолы XAD-1, XAD-2 и XAD-4 фирмы Ром энд Хаас (Германия). Эти смолы представляют собой сополимеры стирола и дивинилбензола с высокой плотностью поперечных связей. Они имеют макросетчатую структуру и сохраняют ее даже после дегидратации. Наиболее эффективные сорбенты для ионной хроматографии были получены на основе смолы XAD-1. Ее превращают в анионообменник путем хлорметилирования и последующего аминирования третичными аминами.

Катионообменники для ионной хроматографии (табл. 6.3) представляют собой сорбенты поверхностно-пористого типа. Как и анионообменники, их получают на основе полимерной матрицы или силикагеля.

Таблица 6.3. Катионообменники для ионной хроматографии

Наименование	Основа	Обменная емкость, ммоль экв./г	Размер частиц, мкм	Изготовитель*
Biotronik BT IV KA	Стирол-дивинилбензол	0,016	10	1
Dionex Cation	Стирол-дивинилбензол	0,03	20–30	2
Dionex HPIC-CS	Полимер	–	13	2
Nucleosil SA-10	Силикагель	1,0	10	5
Partisil 10 SCX	То же	0,01	10	6
TSK-Ge1 IC-Cation	Поливиниловый полимер	0,013	11	9
Vydac 401 TP	Силикагель	–	10	10
Vydac IC 400	То же	–	–	10
Vydac CX	То же	0,1	20–44	10
Waters IC-PAK Cation	Стирол-дивинилбензол	–	10	11
Wescan Cation	То же	–	–	12
Wescan Cation/HS	То же	–	–	12
Zipax SCX	Силикагель	0,005	15–37	13

Примечание: * См. табл. 6.2.

Катионообменники на основе полимерной матрицы готовят обработкой полимерных частиц концентрированной серной кислотой. В результате на поверхности частиц образуется тонкий слой сульфогрупп. Обменная емкость катионообменника связана с толщиной этого слоя и зависит от типа смолы, диаметра частиц, температуры и времени нагревания с серной кислотой. Методика получения таких сорбентов описана в первой статье по ионной хроматографии [66]. Длина диффузионного пути в поверхностно-пористом катионообменнике низкой емкости меньше, чем в обычной катионообменной смоле, так как инертное гидрофобное ядро сорбента ограничивает доступ катионов в его объем. Это приводит к ускорению массообмена катионов и, следовательно, к повышению эффективности разделения. Кроме того, благодаря жесткости ядра частицы сорбента подвергаются меньшему сжатию. Поэтому с такими катионообменниками можно работать при больших давлениях, и, соответственно, при больших скоростях потока, чем с обычными смолами. Катионообменники низкой емкости на основе полимерной матрицы устойчивы при $pH=1-14$ и практически не набухают. Катионообменники на основе силикагеля получают сульфированием в мягких условиях поверхностно-пористых силикагелей. Эти сорбенты обладают всеми достоинствами, свойственными катионообменникам на основе полимерной матрицы. Однако они устойчивы только при $pH\ 2-8$, что ограничивает область их применения.

6.8. Подвижные фазы в высокоэффективной жидкостной хроматографии

Процессы жидкостной хроматографии отличаются тем, что в них имеет место активное взаимодействие подвижной жидкой фазы как с неподвижной фазой (адсорбентом), так и с веществами, подвергаемыми хроматографическому разделению.

Подвижная фаза в жидкостных хроматографических системах выполняет двоякую функцию. С одной стороны, она служит для перемещения десорбированных молекул по колонке. С этой точки зрения представляются наиболее важными физические свойства подвижной фазы, такие как ее вязкость или летучесть и др. С другой стороны, подвижная фаза в жидкостной хроматографии играет активную, химическую по существу роль. Молекулы подвижной фазы взаимодействуют с другими компонентами системы: молекулами разделяемых веществ и молекулами неподвижной фазы. Фактически константы сорбционного равновесия в системе определяются характером подвижной фазы ничуть не менее, чем характером сорбента. Более того, во многих случаях компоненты подвижной фазы способны к прочной сорбции, что приводит к образованию на поверхности сорбента слоя адсорбированных молекул, существенно изменяющего свойства неподвижной фазы. Поэтому вторая, и более важная, функция подвижной фазы – это регулирование констант равновесия и величин удерживания. Возможности регулирования удерживания с помощью подвижной фазы необычайно широки. Нередко заменой одного растворителя другим можно изменить коэффициент емкости в 1000–10000 раз! Однако для практической хроматографии пригоден лишь довольно узкий диапазон величин k – примерно между 1 и 20. Слишком малые значения k непригодны, так как в этой области резко возрастает вероятность взаимного перекрывания пиков. Наоборот, при слишком больших константах сорбции k разделение требует значительно времени. К тому же увеличивается риск не обнаружить более прочно сорбирующиеся компоненты смеси. Таким образом, для решения каждой конкретной задачи состав подвижной фазы должен быть тщательно подобран с точки зрения физических и химических свойств ее компонентов.

Современный хроматограф представляет собой весьма чувствительный комплекс механических, оптических, электрических и химических систем, и его надежная работа во многом зависит от свойств и качества используемых растворителей. Наличие в подвижной фазе механических примесей отрицательно сказывается на работе насоса, вызывая нечеткую работу клапанов и способствуя износу плунжеров и уплотнений. Твердые частицы, накапливаясь на фильтре у входа в колонку, приводят к постепенному увеличению ее сопротивления, плохой воспроизводимости рабочего давления либо времен удерживания, особенно при использовании насосов постоянного давления. Поэтому перед использованием подвижная фаза должна быть профильтрована через керамические фильтры с размером пор около 0,5 мкм. Как правило, повторная фильтрация осуществляется уже в хроматографе, при отборе растворителя из резервуара. Надежная работа насоса также сильно зависит от летучести используемых растворителей. При резком понижении давления в цилиндре насоса при всасывании даже предварительно дегазированные растворители иногда образуют паровые пузыри, нарушающие надежную работу клапанов. Этот эффект наиболее выражен у легколетучих растворителей, (пентан, ацетон, метиленхлорид, диэтиловый эфир). Кроме того, подвижные фазы, содержащие эти вещества, могут изменять свой состав в процессе их использования из-

за испарения, что приводит к невоспроизводимости величин удерживания. В связи с этим в практической работе следует избегать растворителей, кипящих при температуре ниже 60°C . С другой стороны, для менее летучих растворителей характерна более высокая вязкость, что отрицательно отражается на эффективности разделения и вынуждает использовать большие давления для достижения желаемой скорости разделения. Предельно допустимая вязкость подвижной фазы зависит от размера частиц сорбента и качества заполнения колонки. В качестве ориентира можно указать величину 1,5 сП. При такой вязкости и линейной скорости подвижной фазы около 0,4 см/сек давление на входе хорошо заполненной колонки не должно превышать 200 кг/см^2 . Если все же обстоятельства вынуждают использовать более вязкие подвижные фазы, колонку следует термостатировать при повышенной температуре (например, при 60°C). Определенные требования к растворителям предъявляет и используемый метод детектирования. При использовании детекторов, основанных на поглощении света, подвижная фаза должна быть прозрачной в избранной спектральной области. Число растворителей, прозрачных для УФ-излучения вплоть до 190–220 нм, довольно велико. Однако в каждом конкретном случае этот показатель определяется не столько физическими свойствами основного вещества, сколько содержанием примесей, поглощающих свет в УФ-диапазоне. Так как содержание таких примесей часто не нормируется даже для растворителей квалификации «химически чистый», рекомендуется применять растворители специальных квалификаций «для жидкостной хроматографии» или «для спектроскопии». При отсутствии готовых растворителей необходимого качества их можно очистить в лаборатории с помощью методов, изложенных, например, в работах [63, 67].

Таблица 6.4. Свойства некоторых растворителей для ВЭЖХ

Растворитель	Температура кипения, $^{\circ}\text{C}$	Плотность при 20°C	Вязкость, сП, 25°C	Коэффициент преломления	Предел прозрачности для УФ-света, нм
Ацетон	56	0,79	0,30	1,356	330
Ацетонитрил	82	0,78	0,34	1,341	190
Бензол	80	0,88	0,60	1,498	280
Вода	100	1,00	0,89	1,333	200
Гексан	69	0,66	0,30	1,372	190
Гептан	98	0,68	0,40	1,385	195
Дибутиловый эфир	142	0,77	0,64	1,397	220
Диметилформамид	153	0,94	0,80	1,428	268
Диоксан	101	1,03	1,20	1,420	215
Дихлорэтан	83	1,25	0,78	1,442	228
Диэтиловый эфир	35	0,71	0,24	1,350	218
Изооктан	99	0,69	0,47	1,389	197
Изопропиловый эфир	68	0,73	0,38	1,365	220
Метанол	65	0,79	0,54	1,326	205
Метиленхлорид	40	1,33	0,41	1,421	233
Метилэтилкетон	80	0,86	0,38	1,376	329
Метилцеллозольв	125	0,97	1,60	1,400	210
Пентан	36	0,63	0,22	1,355	205
Пропанол-1	97	0,80	1,9	1,385	205

Пропанол-2	82	0,79	1,9	1,384	205
Тетрагидрофуран	66	0,89	0,46	1,405	212
Толуол	110	0,87	0,55	1,494	285
Триэтиламин	89	0,73	0,36	1,398	—
Уксусная кислота	118	1,05	1,10	1,370	230
Хлороформ	61	1,49	0,53	1,443	245
Циклогексан	81	0,78	0,90	1,423	200
Четыреххлористый углерод	77	1,60	0,90	1,457	265
Этанол	78	0,79	1,08	1,359	210
Этилацетат	77	0,90	0,43	1,370	256
Этиленгликоль	182	1,10	1,05	1,431	210

Чувствительность рефрактометрического детектора зависит от разности коэффициентов преломления подвижной фазы и анализируемых соединений. На этом основании для большинства случаев можно рекомендовать подвижные фазы с минимальными величинами коэффициентов преломления. Характеристики растворителей, наиболее важные с хроматографической точки зрения, приведены в табл. 6.4.

Растворители, применяемые в ВЭЖХ, различаются по прочности сорбции и по силе взаимодействия с разделяемыми веществами. Одни из них способны смыть с колонки лишь слабосвязанные сорбаты, другие – вызывают десорбцию почти любых молекул. Ясно, что состояние равновесия в системе в конечном итоге определяется балансом межмолекулярных взаимодействий. В частности, молекулы подвижной фазы могут взаимодействовать с молекулами разделяемых веществ. Образующиеся ассоциаты, даже и очень нестойкие, почти неизбежно имеют сродство к сорбенту, отличающееся от сродства неассоциированных молекул. В результате ассоциации сорбция может стать менее или более прочной. С другой стороны, молекулы подвижной фазы могут конкурировать на поверхности сорбента с молекулами разделяемых соединений, вытесняя последние с активных центров и способствуя смещению равновесия в сторону десорбции.

В жидкостной хроматографии наиболее важны дисперсионное и диполь-дипольное межмолекулярные взаимодействия, образование водородных связей, электростатическое взаимодействие между разноименно заряженными ионами. Для определения общего характера влияния того или иного растворителя на удерживание используют понятие *элюирующей* силы. Элюирующая сила подвижной фазы – это ее способность вступать в такие межмолекулярные взаимодействия с компонентами хроматографической системы, которые способствуют десорбции разделяемых соединений и более быстрому перемещению хроматографических зон.

Для выполнения транспортной функции в подвижной фазе пригодны любые жидкости, достаточно хорошо растворяющие компоненты пробы. Выбор таких жидкостей довольно широк. Однако поиск растворителей подходящей элюирующей силы может осуществляться только методом проб и ошибок. Многократного увеличения гибкости метода ВЭЖХ, обогащения его возможностей достигают за счет применения в качестве подвижных фаз смесей растворителей. Принцип составления таких смесей прост. Необходимо взять два индивидуальных растворителя: один с заведомо недостаточной элюирующей силой, другой – с заведомо избыточной. Из этих двух основных растворителей можно приготовить смеси, которые будут обладать подходящей элюирующей силой.

В соответствии со сложившейся практикой при описании состава подвижных фаз, состоящих из двух растворителей А и Б, концентрация растворителя Б выражается в объемных долях и далее обозначается как С (%). Символом C_2 в необходимых случаях обозначается мольная концентрация третьего растворителя В.

Элюирующая сила растворителя является экспериментально определяемым интегральным параметром, отражающим некоторую усредненную способность данного вещества к межмолекулярным взаимодействиям различной природы. Выражение «подходящая сила растворителя» означает, что на данном сорбенте данному сорбату соответствует приемлемое значение k . В то же время ясно, что для разделения двух соединений подойдет не каждая из подвижных фаз, обладающих необходимой элюирующей силой. Часто на хроматограммах отдельные пары пиков имеют недостаточное разделение. В таких случаях говорят, что селективность системы недостаточна. Селективность системы, в которой используется данная неподвижная фаза, в первую очередь определяется селективностью используемой подвижной фазы, ее способностью к специфическим взаимодействиям с сорбатами, обладающими определенными особенностями молекулярного строения. Характер элюирующей силы данного растворителя или смеси растворителей по отношению к сорбатам различного строения может быть различным. Селективность, как и элюирующая сила бинарной подвижной фазы, определяется прежде всего природой ее более полярного компонента.

Описанный подход к подбору состава подвижных фаз для ВЭЖХ в настоящее время общепринят. В состав почти любой подвижной фазы входит компонент, сорбционно менее активный, выполняющий преимущественно транспортную функцию, и компонент, сорбционно активный, служащий для регулирования равновесия. В соответствии со сложившейся практикой растворители первого рода обозначают буквой А, а растворители второго рода – буквой Б. Естественно, роль одного и того же компонента в различных подвижных фазах и в зависимости от характера неподвижной фазы различна. Например, в подвижной фазе гексан–хлороформ последнее соединение выступает в качестве растворителя Б, а в системе хлороформ–метанол – как растворитель А.

С целью повышения селективности разделения часто используют подвижные фазы более сложного состава, чем бинарные смеси А+Б: например, $A+B_1+B_2$ или даже $A+B_1+B_2+B_3$. Во многих случаях это приводит к улучшению разделения, хотя, судя по опубликованным в литературе методикам разделения, применение трех-или четырехкомпонентных подвижных фаз редко бывает оправдано, особенно если разделяемая смесь не слишком сложна. Необходимость использования, например, трехкомпонентного элюента может возникнуть лишь при анализе трехкомпонентных и более сложных смесей.

Приведенная общая тактика выбора состава подвижной фазы непосредственно применима лишь в простейших случаях, в отсутствие затруднений, связанных с особым химическим характером разделяемых веществ. При изучении высокополярных ионогенных соединений зачастую не удается найти удовлетворительного решения этим простейшим способом, так как для них характерна тенденция образовывать асимметрические, аномально уширенные хроматографические зоны. Устранить ряд нежелательных явлений, а также изменить в нужном направлении свойства применяемого сорбента можно с помощью специфических модификаторов – добавок, вводимых в подвижную фазу в небольших количествах (0,01–2%) с целью изменения термодинамических характеристик процесса. Действие модификаторов может быть связано с

различными физико-химическими процессами. Они могут блокировать наиболее сорбционно активные центры неподвижной фазы, повышая тем самым ее химическую однородность. В других случаях модификатор может использоваться для подавления ионизации сорбата, что обычно приводит к улучшению формы пика.

При использовании современных высокоэффективных колонок для анализа смесей не слишком сложного состава обычно требуется только один органический модификатор. Выбор его определяется в первую очередь его физическими свойствами, стоимостью, доступностью, а иногда и личным вкусом экспериментатора. При этом выбор состава подвижной фазы сводится (если решен вопрос о необходимости специфических модификаторов) к выбору оптимальной концентрации органического растворителя. Однако по мере усложнения анализируемой смеси нарастает вероятность того, что коэффициенты емкости некоторых компонентов будут слишком близки и разделить их не удастся даже при очень высокой эффективности применяемых колонок. В то же время разделение других компонентов может быть настолько хорошим, что между ними на хроматограмме можно было бы разместить еще несколько пиков. В таких случаях встает вопрос об оптимизации селективности системы за счет применения других комбинаций растворителей. Выбор органических растворителей, отвечающих основным требованиям обращенно-фазовой ВЭЖХ, невелик. Практически только три растворителя, пригодные для обращенно-фазовых разделений, обладают существенно различающейся селективностью: метанол, ацетонитрил и тетрагидрофуран. Изредка применяемый этанол в смысле селективности дублирует метанол, а диоксан незначительно отличается от тетрагидрофурана. К тому же наиболее сильные взаимодействия в обращенно-фазовой хроматографии имеют место в подвижной фазе между молекулами воды, так что роль этих растворителей в обеспечении селективности вообще не столь велика, как при хроматографии на силикагеле. Многочисленные монографии и обзоры работ по вопросам оптимизации селективности и по технике ВЭЖХ [68–74] позволяют заинтересованным читателям ознакомиться во всей полноте как с проблемой выбора подвижной фазы, так и с практическими вопросами ВЭЖХ. Тем не менее некоторые практические аспекты этого метода рассмотрены в следующей главе.

6.9. Выражение параметров удерживания в хроматографии

Параметры удерживания веществ в хроматографии определяются величинами энергии их взаимодействия с находящимся в колонке сорбентом при данных экспериментальных условиях (т.е. при наличии в колонке подвижной фазы, взаимодействующей с данным веществом, а также при существующих в колонке температуре и давлении). Время удерживания, кроме того, прямо связано и со скоростью продвижения подвижной фазы по колонке. Выдержать строго постоянными все эти факторы для какого-либо вещества в разное время и тем более в разных лабораториях практически невозможно. Поэтому непосредственно измеряемые величины удерживания в разное время, на разных приборах и в разных лабораториях, как правило, различаются не менее, чем на 10–15% своей величины. Для того чтобы получить величины, в меньшей степени зависящие от конкретных экспериментальных условий, используют относительные величины. Для этого принимают одно из веществ за стандартное и параметры удерживания всех других веществ относят к параметрам удерживания этого стандартного соединения. В том случае, когда параметры удерживания веществ исследуемой

группы различаются более, чем в десять раз, прибегают к интерполяционному способу выражения параметров удерживания. При этом принимают за стандартное уже не одно какое-либо соединение, а целый гомологический ряд и характеризуют каждое из изучаемых веществ его относительным положением среди этих гомологов.

Так, например, в газовой хроматографии за такой гомологический ряд принимают серию нормальных углеводородов. Удерживание каждого из них в любой хроматографической системе обозначают индексом, численно равным умноженным на 100 числу атомов углерода в данном члене гомологического ряда.

Индекс удерживания любого другого вещества определяют по следующей интерполяционной формуле, предложенной Ковачем [75,76]

$$I = 100n + 100 \frac{\lg V'_n - \lg V'_n}{\lg V'_{n+1} - \lg V'_n} \quad (13)$$

При этом учитывается характерная для газовой хроматографии близкая к линейной зависимость логарифма исправленного объема удерживания от числа атомов углерода в молекуле членов большого числа гомологических рядов. Обычно, расхождение в величинах индексов удерживания одного и того же вещества в одной и той же хроматографической системе, определенных в разных лабораториях (межлабораторная воспроизводимость) не превышает 0,2–0,5% отн., т.е. 3–5 единиц индекса (е.и.). Эти интерполяционные величины принято называть Индексы Ковача.

В жидкостной хроматографии вследствие интенсивного влияния подвижной фазы зависимости удерживания от молекулярного строения разделяемых соединений значительно более сложны. Тем не менее для характеристики удерживания наркотических и лекарственных веществ были предложены системы индексов удерживания, в которых в качестве опорных гомологических рядов выбраны серии достаточно полярных соединений. Большие серии данных по удерживанию наркотических и лекарственных веществ накоплены при использовании в качестве опорного гомологического ряда серии нитроалканов нормального строения, $R-NO_2$ [77–79]. При этом для определения индексов удерживания большого числа наркотических и лекарственных средств, а также ряда эндогенных веществ использован ряд вторичных стандартов, индексы удерживания которых были определены предварительно с максимально возможной точностью. Эти данные приведены в таблице 6.5, а на рис. 6.22 приведены хроматограммы смесей перечисленных в таблице веществ, зарегистрированные при использовании колонок размером 125x4 мм с обращенно-фазовым адсорбентом Суперсфер 100RP-18 с размером частиц 4 мкм в условиях градиентного элюирования смесью ацетонитрила с фосфатно-триэтиламмонийным буфером (25 мМ, рН 3,0) [77, 80]. Градиентное элюирование выполняли в пределах содержания ацетонитрила в элюенте от 0 до 10% в течение 30 мин. Далее в течение 5 мин проводили элюирование смесью вышеуказанного буферного раствора с 10% ацетонитрила.

Таблица 6.5. Индексы удерживания соединений, используемых в качестве вторичных стандартов [79]

Вещества	I	Вещества основного характера	I
Парацетамол	234	Морфин	198
Барбитал	287	Хлороквин	265
Браллобарбитал	359	Бензоилэкгонин	295
Пентобарбитал	405	Кокаин	336
Секобарбитал	437	Дифенилгидрамин	385
Клобазам	484	Галоперидол	409
Индометацин	610	Амитриптилин	446
Прозепам	648	Тиоридазин	504
		Меклозин	601
		Амиодарон	762

Таким образом, в работе [80] были охарактеризованы 349 соединений. В целом при таком подходе было показано, что межлабораторная воспроизводимость индексов удерживания характеризуется величинами стандартного отклонения 6,9 и 8,4 е.и. для кислотных и основных веществ, соответственно [81–83].

Показано, что индексы удерживания токсикологически важных веществ, извлеченных из биологических образцов, с хорошей точностью совпадают с величинами, полученными для чистых препаратов [84, 85].

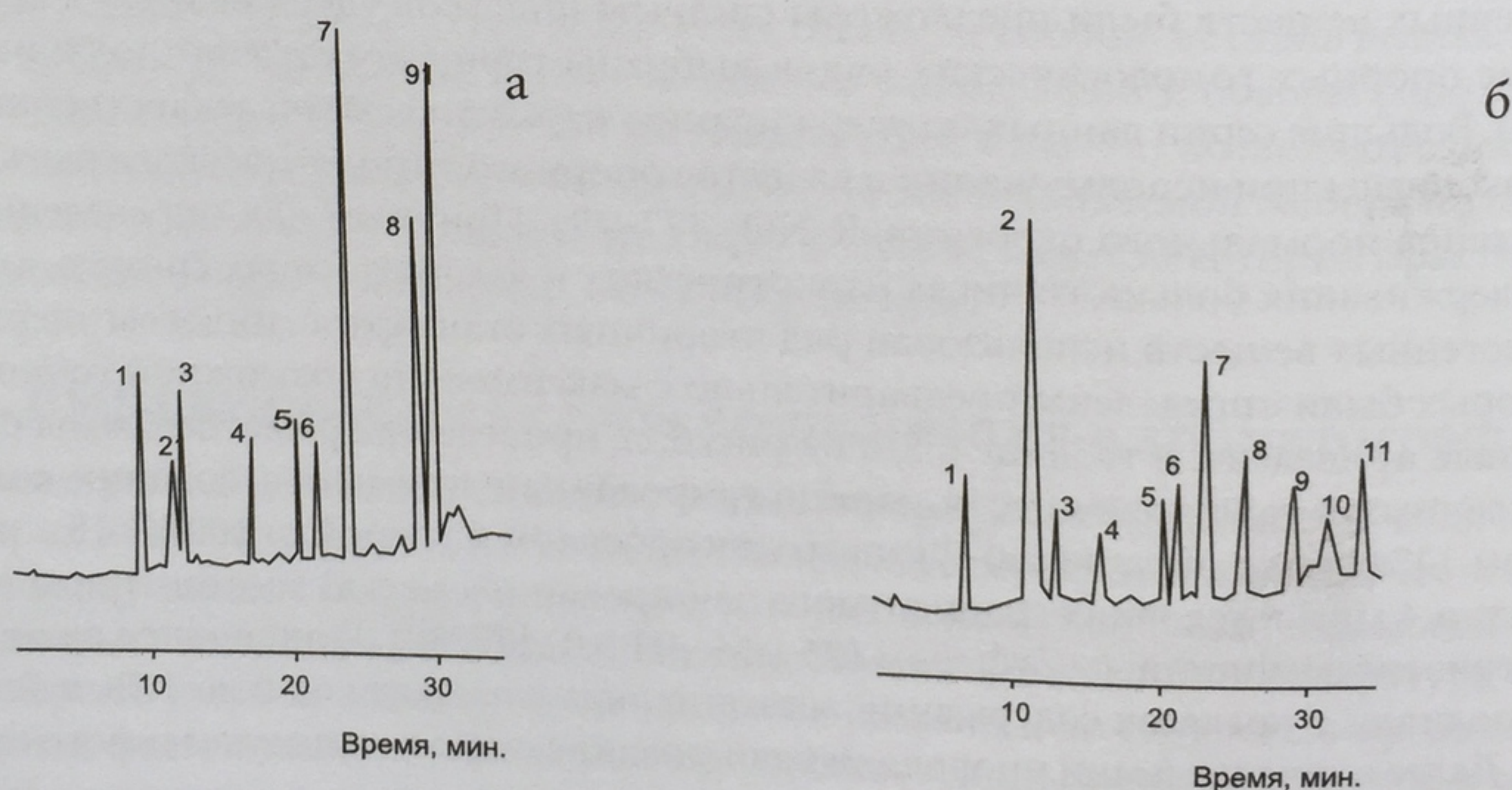


Рис. 6.22. Хроматограммы вторичных стандартов (а) кислотных и нейтральных соединений и (б) соединений основного характера. Колонка размером 125×4 мм с сорбентом Суперсфер 100 RP-18 с величиной частиц 4 мкм, подвижная фаза – смесь триэтиламмонийфосфатного буфера (концентрация 25 мМ, рН 3.0) и ацетонитрила с градиентным элюированием от 0 до 70% ацетонитрила. Скорость элюента 1 мл/мин, объем пробы 5–10 мкл: (а): 1 – парацетамол; 2 – неидентифицированная примесь; 3 – барбитал; 4 – браллобарбитал; 5 – пентобарбитал; 6 – секобарбитал; 7 – клобазам; 8 – индометацин; 9 – прозепам; (б): 1 – морфин; 2 – хлороквин; 3 – бензоилэкгонин; 4 – кокаин; 5 – дифенилгидрамин; 6 – галоперидол; 7 – амитриптилин; 8 – тиоридазин; 9 – меклозин; 10 – неидентифицированная примесь; 11 – амиодарон [77].

Высокая разделяющая способность современного метода жидкостной хроматографии в сочетании с высокой чувствительностью применяемых детектирующих систем позволяет успешно решать исключительно сложные аналитические задачи. В частности, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии может применяться для контроля содержания производных лизергиновой кислоты (ЛСД) в моче и в плазме крови субъектов, употребляющих это наркотическое средство (рис. 6.22) [86]. Такой анализ оказывается почти невыполнимым с помощью других аналитических методов вследствие исключительно высокой физиологической активности этого наркотического препарата и, как следствие, очень низких его концентраций в биологических жидкостях применяющих его наркоманов.

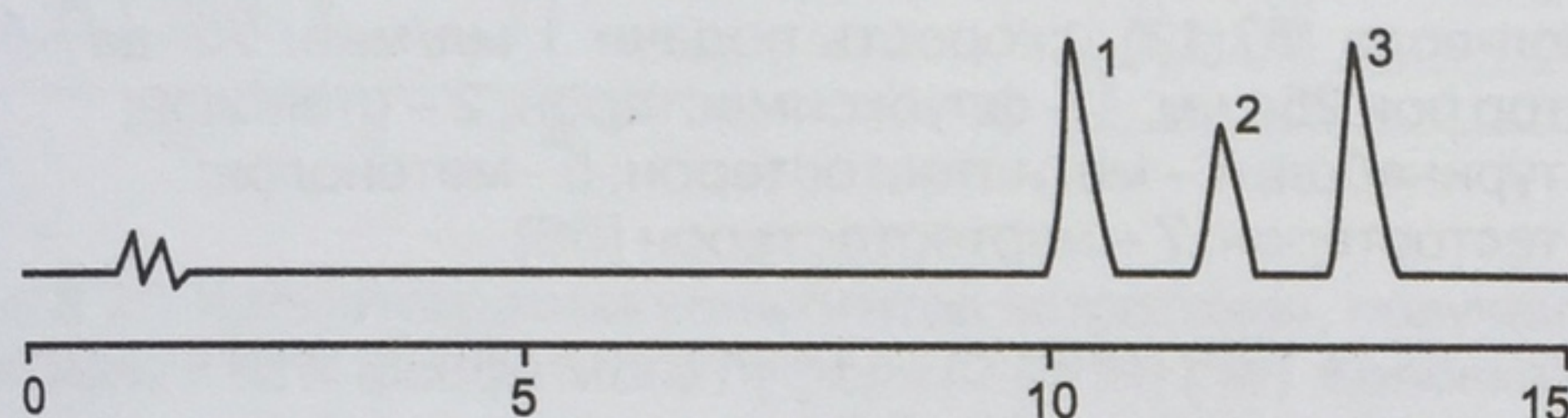
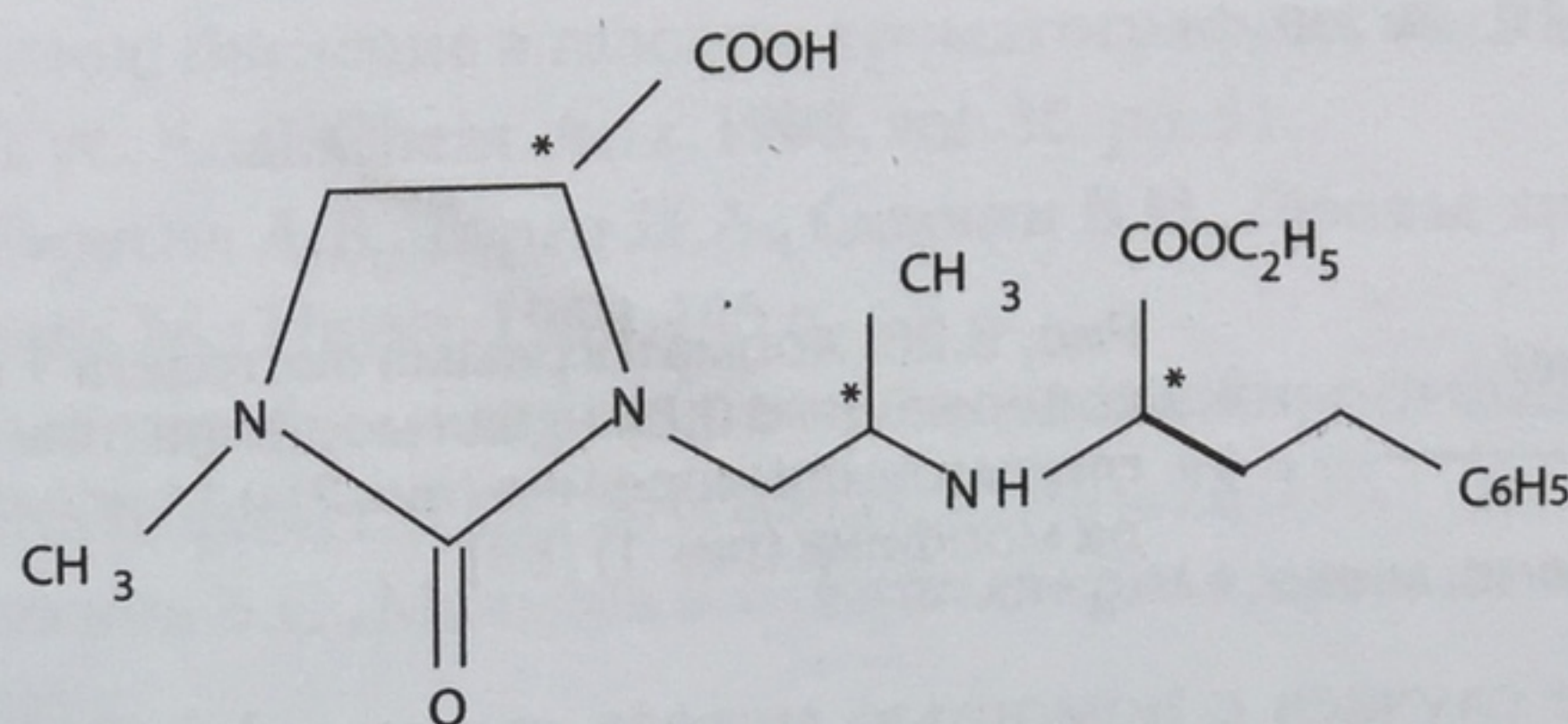


Рис. 6.22. Хроматограмма смеси производных лизергиновой кислоты. Подвижная фаза — смесь аммонийно-ацетатного буфера и ацетонитрила (3:1); УФ-детектор: 1 — метизергид; 2 — диэтиламид лизергиновой кислоты (ЛСД); 3 — N-метил-N-пропиламид лизергиновой кислоты (ЛАМПА) [85]

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии успешно применяется также и для контроля содержания анаболических препаратов в моче и плазме крови спортсменов. Пример хроматографического разделения сложной смеси анаболиков приведен на рис. 6.24 [56].

Наконец, при использовании оптически активных компонентов в составе подвижных фаз или в качестве реагентов при подготовке сорбентов метод высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяет разделять оптические изомеры различных соединений. Эта аналитическая задача оказывается исключительно важной вследствие того, что разные оптические изомеры многих лекарственных и иных физиологически активных соединений значительно различаются по своей биологической активности, а во многих случаях и по характеру их фармакологического действия. Показательным примером может служить разделение восьми оптических изомеров противогипертензивного средства имидаприла, имеющего в молекуле три асимметрических атома углерода и следовательно имеющего 8 оптических изомеров, причем один из них (SSS-изомер) обладает значительно более высокой активностью, чем остальные.

Химическая структура имидаприла выражается следующей формулой:



Звездочками отмечены асимметрические атомы углерода. Все восемь энантиомерных форм этого соединения были разделены в форме диастереомеров — производных хирального агента, бромида L-аланин-нафтиламида в условиях, указанных в подписи

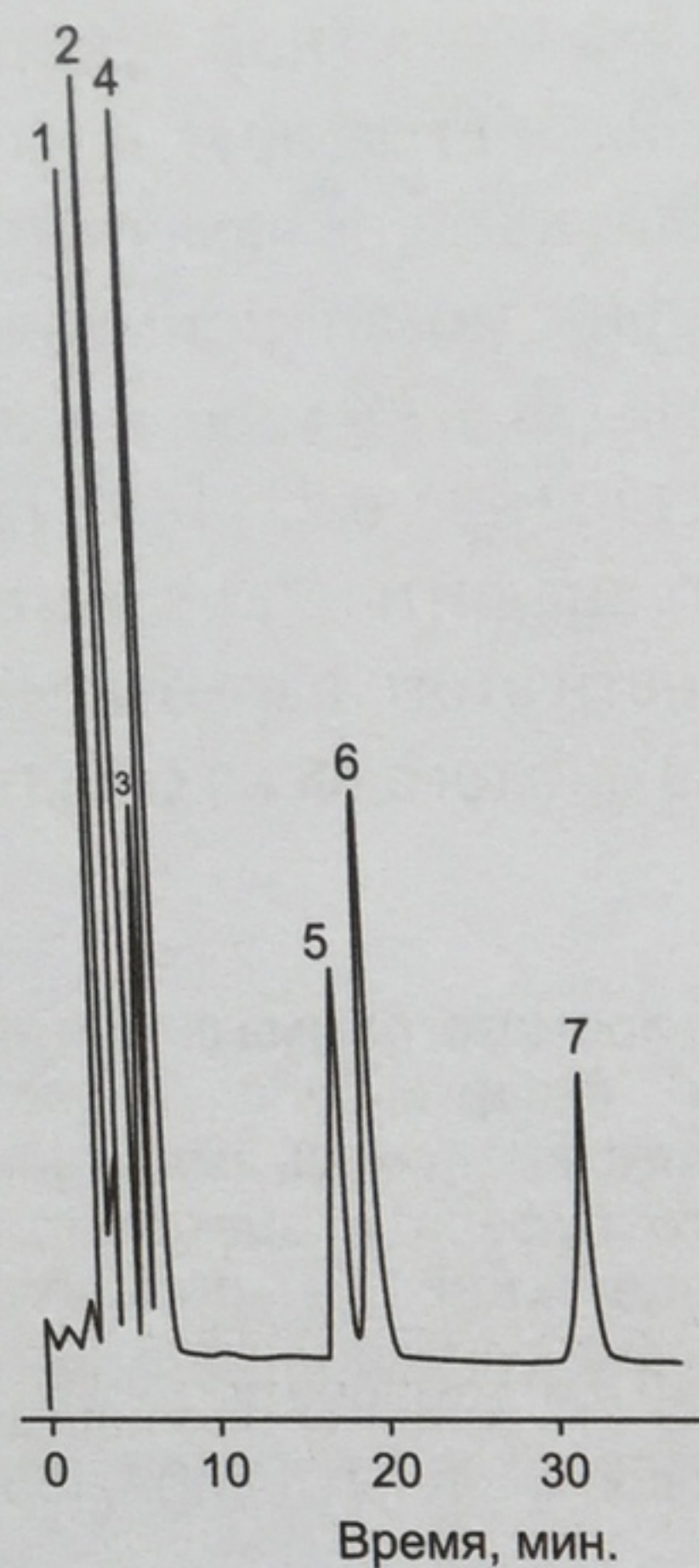


Рис. 6.24. Хроматограмма смеси анаболических средств. Колонка размером 250×4 мм; сорбент Сепарон SGX C18 (фирма «Томахром», США); подвижная фаза – смесь метанол-вода (87:13), скорость подачи 1 мл/мин. УФ-детектор при 254 нм: 1 – флуоксиместерон; 2 – стенолон; 3 – туринабол; 4 – метилтестостерон; 5 – метенолон; 6 – тестостерон; 7 – нортестостерон [56]

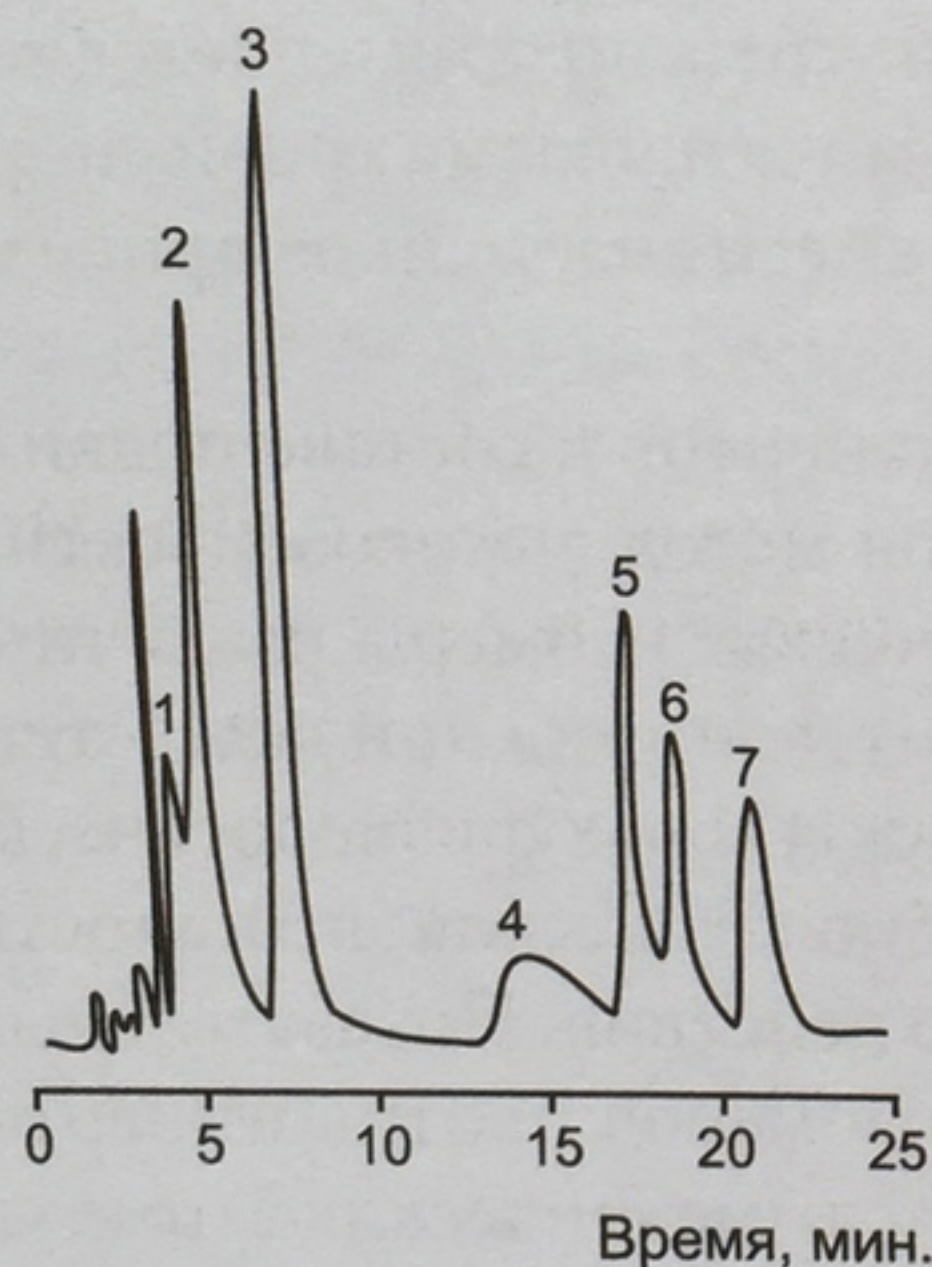


Рис. 6.25. Хроматограмма смеси восьми оптических изомеров хиральных диастереомерных производных имидаприла, полученных реакцией с гидробромидом L-аланин-β-нафтиламида. Колонка размером 150×4.6 мм; сорбент Зорбакс Sil с величиной зерна 5 мкм; подвижная фаза – смесь хлороформ-метанол-этанол-диэтиламин (600:10:2:0.1), скорость подачи 1 мл/мин; УФ-детектирование при 254 нм [84]: 1 – SRS-изомер; 2 – SRR-изомер; 3 – SSS-изомер + SSR-изомер; 4 – RSS-изомер; 5 – RRR-изомер; 6 – RRS-изомер; 7 – RSS-изомер [87].

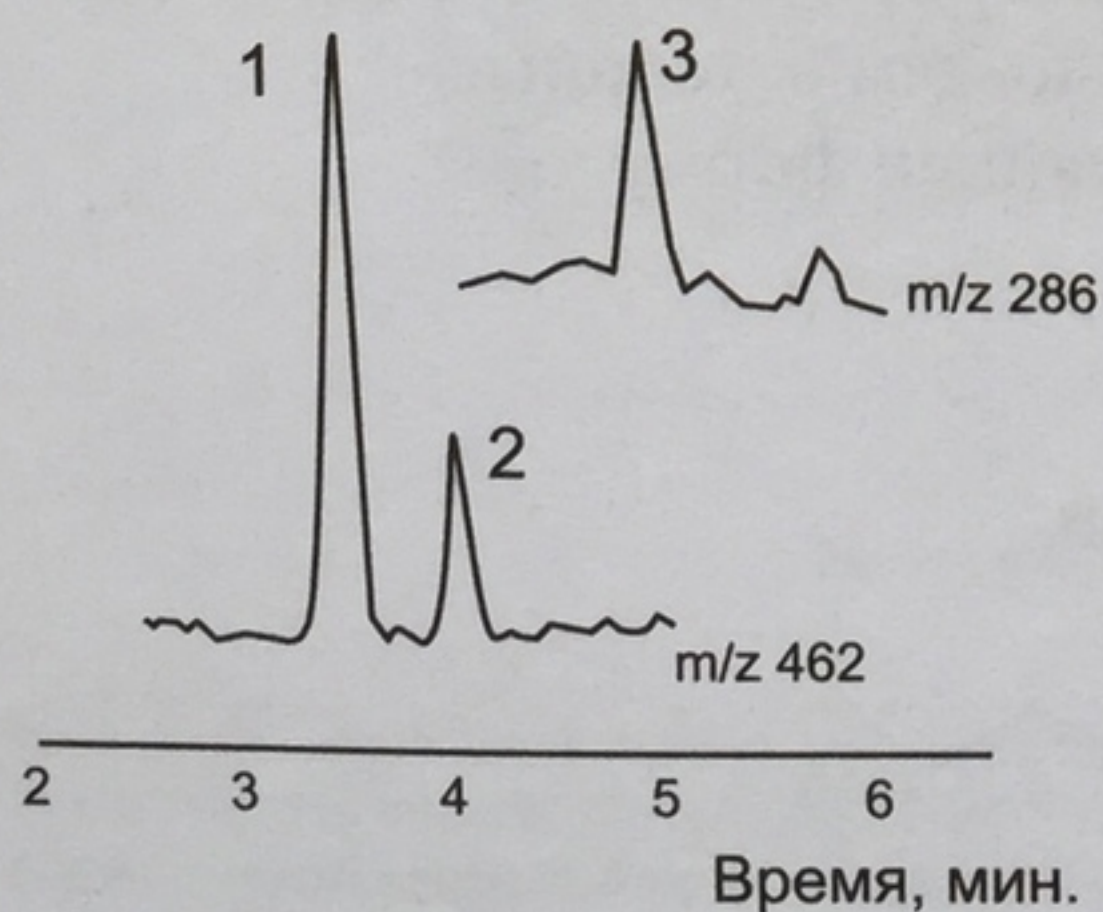


Рис. 6.26. Хроматограмма экстракта 1 мл сыворотки крови, содержащего 0,84 нг/мл морфина (пик 3), 2,0 нг/мл 6-моноглюкуронида морфина (пик 2) и 11 нг/мл 3-моноглюкуронида морфина (пик 1) [88]

к рис. 6.25 [89]. В ряде случаев с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии оказывается возможным определить содержание наркотиков и анаболических препаратов, присутствующих в биологических объектах в форме конъюгатов с глюкуроновой кислотой или с иными способными к конъюгации соединениями

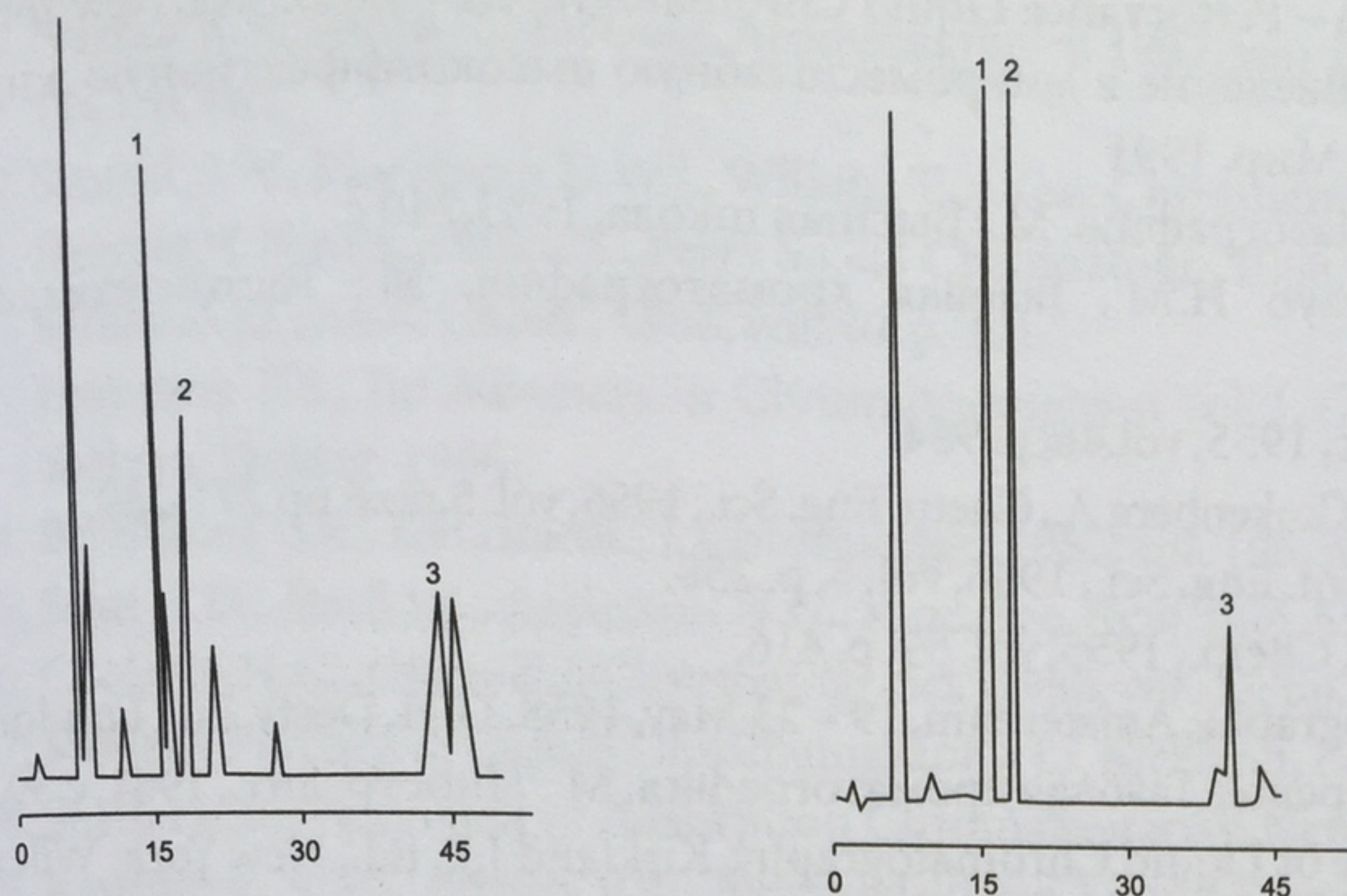


Рис. 6.27. Хроматограмма конъюгатов эстрогенов, полученная с подвижной фазой – смесью 7% н-бутанола и 93% фосфатного буфера (0.05 M) [38]. Колонка размером 150×3 мм; температура 70°C; неподвижная фаза: лихросорб RP-2; УФ-детектирование при 229 нм. Обозначение пиков; 1 – 3-β-D-глюкуронид эстриола; 2 – 3-сульфат эстриола; 3 – 17-β-D-глюкуронид эстриола; 4 – β-D-глюкуронид тестостерона; 5 – 17-β-D-глюкуронид эстрадиола-17β; 6 – 3-сульфат эквиленина; 7 – 3-сульфат 17α-дигидроэквиленина; 8 – 3-сульфат эстрона; 9 – 3β-D-глюкуронид эстрадиола-17β.

(рис. 6.26 и 6.27) [38, 88, 90]. Пример определения морфина, присутствующего в плазме крови как в форме свободного соединения, так и в форме конъюгатов с глюкуроновой кислотой по гидроксильным группам в положениях 3 и 6, приведен на рис. 6.26 [80]. Показательный пример приведен также на рис. 6.27 [87, 88]. Приведенные данные наглядно демонстрируют исключительно широкие аналитические возможности метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в анализе лекарственных, наркотических и допинговых средств.

Литература

1. Цвет М.С., Труды Варшавского общества естествоиспытателей, Отд. Биологии, 1903, т. 14, разд. 6, с. 20.
2. Tswett M. S., Berichte der Deutschen Botanische Gesellschaft, 1906, B. 24, S. 384-393.
3. McNair H.M., Bonelli E.J., Basic Gas Chromatography, Oakland, CA: Consolidated Printers, 1967; русский перевод: Введение в газовую хроматографию, М.: Мир, 1970.
4. Sue S.T., Rijnders G.W., Anal. Chem. Acta, 1968, vol. 38, pp. 31.
5. Вигдергауз М.С., Гарусов А.В., Езрец Ц.А., Семкин В.И., Газовая хроматография с неидеальными элюентами, М.: Наука, 1980, 145 с.
6. Руденко Б.А., Хроматография с парообразными подвижными фазами. В сб. Итоги науки и техники. Хроматография, т. 3, М.: ВИНТИ, 1980, с. 78-136.
7. Беленький Б.Г., Ганкина Э.С., Мальцев В.Г., Капиллярная жидкостная хроматография, Ленинград: Наука, 206 с.
8. Руденко Б.А., Капиллярная хроматография, М.: Наука, 1978, 206 с.

9. Introduction to Microscale High - Performance Liquid Chromatography, Ishii D., Ed., New York: VCH, 1988; русский перевод: Введение в микромасштабную высокоэффективную жидкостную хроматографию, М.: Мир, 1991
10. Айвазов Б.В., Введение в хроматографию, М.: Высшая школа, 1983, 240 с.
11. Жуховицкий А.А., Туркельтауб Н.М., Газовая хроматография, М.: Гостоптехиздат, 1962, 158 с.
12. Glueckauf E., Trans. Faraday Soc, 1955, vol.46, p. 984.
13. Van Deemter J.J., Zuiderweg F.J., Klinkenberg A., Chem. Eng. Sci., 1956, vol. 5, no.6, pp.271-289.
14. Klinkenberg A., Sjenitzer F., Chem. Eng. Sci., 1956, vol. 5, p. 258.
15. Giddings J.C., Eyring H., J. Phys. Chem., 1955, vol. 59, p. 416.
16. Goldy M. J. E., In: Gas Chromatography, Amsterdam, 19 - 23 May, 1958, D. H. Desty, Ed., London: Butterworths, 1958, русский перевод: Газовая хроматография, М.: Иностран. лит., 1961, с.39.
17. Snyder L.R., In: Modern Practice of Liquid Chromatography, Kirkland J.J., Ed., New York: Wiley, 1971, p. 187.
18. Engelhardt Y., Hochdruck-Flussigkeits-Chromatographie, Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, 1977; русский перевод: Жидкостная хроматография при высоких давлениях, М., Мир, 1980, 245 с.
19. Giddings J.C., Dynamics of Chromatography, New York: M. Dekker, 1965.
20. Purnell J.N., Nature, 1959, vol. 184, no. 1, p. 2009.
21. Киселев А.В., Яшин Я.И., Адсорбционная газовая и жидкостная хроматография, М.: Химия, 1979, 287 с.
22. Piel E.V., Anal. Chem., 1966, vol. 38, no.21, p. 670.
23. Kirkland J.J., Anal. Chem., 1969., vol. 41, no. 1, p. 218.
24. Van Niekerk F.A., Pretorius V., In: Advances in Chromatography, 1967; Zlatkis A., Ed., Evanston: Preston, 1967, p. 167.
25. Samuelson O., Ion Exchange Separation in Analytical Chemistry, 1964.
26. Daldrup T., Kardel B., Chromatographia, 1984, vol. 18, pp. 81 - 83.
27. Engelhardt H., Muller H., Dreuer B., Chromatographia, 1984, vol. 19, pp. 240 - 245.
28. Olmacht R., Halasz I., Chromatographia, 1981, vol. 14, pp. 155 - 161.
29. Martin A.J.P., Synge R.I.M., Biochem. J., 1941, vol. 35, p. 1358.
30. Perry S.G., Amos R., Brewer P.I., Practical Liquid Chromatography, New York-London: Plenum Press, 1972; русский перевод: Практическое руководство по жидкостной хроматографии, М., Мир, 1974, 260 с.
31. Dörfer K., Ionenaustausch-chromatographie, Berlin: Akademie-Verlag, 1963.
32. Porath J., Flodin P., Nature, 1959, vol. 183, p. 1657.
33. Lowe C.R., Dean P.D.G., Affinity Chromatography, New York: Wiley, 1974.
34. Liquid Column Chromatography, Deyl Z., Maček K., Janak J., Eds., Amsterdam: Elsevier, 1975.
35. Рогинский В.В., Гапон Т.Б., Хроматография в биологии, М.: Академиздат, 1953, 50 с.
36. Halasz I., Horvath C., Anal. Chem., 1964, vol. 36, pp. 1178, 2226.
37. Kirkland J.J., J. Chromatogr. Sci., 1969, vol. 7, p. 7. 1227.
38. Sie S.T., van den Hoed N., In: Advances in Chromatography, 1961, Zlatkis A., Ed. Evanston, Preston, 1969, p. 318.

39. Hurrell R.A., Amos R., In: Gas Chromatography, 1962, van Sway M., Ed., Butterworths, London, 1963, p. 162.
40. Scott R.P.W., Blackburn D.W.J., Wilkins T., J. Gas Chromatogr., 1967, vol. 5, no. 4, p. 1967.
41. Stewart H.N.M.S., Amos S., Perry S.G., I Chromatogr., 1968, vol. 38, p. 209.
42. Kirkland J.J., Anal. Chem., 1968, vol. 40, p. 391.
43. Hamilton P.B., In: Advances in Chromatographym vol 2, Giddings J.C., Keller R.A., Eds., New York: m. Dekker, 1966.
44. Berendsen G.E., DeGalanR., J. Chromatogr., 1980, vol. 196, no.1, pp. 21-37.
45. Scott C.D., Attril J.E., Anderson N.G., Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 1967, vol. 125, p. 181.
46. Cooke N.H.C., Olsen K.J. Chromatogr. Sci., 1980, vol. 18, pp. 1-12.
47. Modern Practice of Liquid Chromatography, J.J. Kirkland, Ed., New York: Wiley, 1971.
48. Snyder L.R., Principles of Adsorption Chromatography, New York; M. Dekker, 1968.
49. Krstulovic A.M., Brown P.R., Reversed-Phase Liquid Chromatography: Theory, Practice and Biomedical Applications, New York: Wiley, 1982.
50. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В., Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография, Москва: Химия, 1986.
51. Tagliaro F., Antonioli C, De Battisti L., Ghielmi S., Mango M., J. Chromatogr., A, 1994, vol. 674, pp. 207-215.
52. Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В., Анализ наркотических средств, М.: Мысль, 1993, 270 с.
53. Doyle T.D., Levine J., Anal. Chem. 1967, vol. 39, pp. 1282-1287.
54. Patel Y.P., Patel S., Bhoir I.C., Sundarasesan M., J. Chromatogr. A, 1998, vol. 828, pp. 283-286
55. Petterson L., Eriksson C J., J. Chromatogr. B, 1994, vol. 657, pp.31-36.
56. Restek Catalogue, Bellefonte, PA: Restek Corp., 2003.
57. Fritz J.S., Gjerde D.T., Poland K., Ion Chromatography, Heidelberg: Huthig, 1982; русский перевод: Ионная хроматография, М.: Химия, 1984, 186 с.
58. Cochrane R.A., Hillman D.E., J. Chromatogr., 1982, vol. 241, pp. 392-394.
59. Small H., Vffler T.T., Anal. Chem., 1982, vol. 54, no. 2, pp. 452-466.
60. Bond A.M. et al. Anal. Chem., 1982, vol. 54, no. 3, pp. 582-585.
61. McAlleese D.L., Anal. Chem., 1987, vol. 59, no. 3, pp. 541-543.
62. Litvina M.L., Voloschik I.N., Rudenko B A., J. Chromatogr. A, 1994, vol 671, pp.29-32.
63. Справочник химика, т. 1-3, Москва-Ленинград, Госхимиздат, 1952.
64. Horvath C., Priss B., Lipsky S.K., Anal. Chem. 1967, vol. 39, no. 12, pp. 1422 -1428.
65. Haldna U., Palvadre R., Pentshuk J. et al., J. Chromatogr. 1985, vol. 350, pp. 296 - 298.
- 66 Gjerde D.T., Fritz J.C., Schmuckler G., J. Chromatogr. 1979, vol. 186, pp. 509 - 519.
67. Liquid Column Chromatography, Deyl Z., Maček K., Janak J., Eds., Amsterdam: Elsevier, 1975; русский перевод: Жидкостная колоночная хроматография, М.: Мир, 1978, т. 1, с. 309-365.
68. Debets H.J.G., J. Liquid Chromatogr., 1985, vol. 8, no. 15, pp. 2725-2780.109.
69. Glajch J.L., Kirkland J.J., Anal. Chem., 1983, vol. 55, no.2, pp. 319A-336A.
70. Snyder L.R., Dolon J.W., Gant J.R., J. Chromatogr., 1979, vol. 165, no.1, pp. 3-30.
71. Snyder L.R., J. Chromatogr. Sci., 1978, vol. 16, no. 6, pp. 223-234.
72. Hara S., J. Chromatogr., 1977, vol. 137, no.1, pp. 41-52.
73. Hara S., Fujii Y., Hirasawa S., M., Migamoto, I Chromatogr., 19878, vol. 149, no. 1, pp. 143-159.
74. Jandera P., Churasek J., Gradient Elution in Liquid chromatography, Amsterdam: Elsevier, 1985.

75. Kovats E., *Helv. Chim. Acta*, 1958, vol. 41, p. 1945.
76. Эттре Л.С., *Успехи химии*, 1966, т. 35, вып. 10, 1883.
77. Bogusz M., Wu M., *J Anal. Toxicol*, 1991, vol. 387, p. 404.
78. Bogusz M., *J. Chromatogr.*, 1987, vol 387, p. 404.
79. Bogusz M., Erkens M., *J. Chromatogr. A*, 1994, vol. 674, pp. 97-126.
80. Bogusz M., Erkens M., Franke J.P., Wijbek R.A., de Zeeuw R.A., *J. Liquid Chromatogr.*, 1993, vol. 16, pp. 1341.
81. Franke J.P., de Zeeuw R.A., In: *The Analysis of Drugs of Abuse*, Gough T.A., Ed., Chichester: Wiley, 1991, p. 93.
82. Bogusz M., Franke J. P., Wijbek R.A., de Zeeuw R.A., In: *Forensic Toxicology*, Koempe B., Ed., Kopenhagen: 1991, p. 93.
83. Bogusz M., Erkens M., Maier R.D., Schroderl., *J. Liquid Chromatogr.*, 1992, vol. 15, pp. 127.
84. Franke J.P., de Zeeuw R.A., Schepers.P.G., *Forensic Sci.*, 1985, vol. 30, p.1074.
85. Webb K., *VAM Bulletin*, 1996, no. 15, pp. 15-17.
86. Thomachrom, Reichelt Chemietechnik Catalogue, Heidelberg: Reichelt, 1988, S.4.
87. Nishi H., Yamasaki K. Kokusema Y., Sato T., *J. Chromatogr. A*, 1994, vol.672, pp. 125-133
88. Tyrefors N., Hyllbrant B., Ekman L., Johansson M., Lsngstrum B., *J. Chromatogr. A*, 1996, vol. 729, pp. 279-285.
89. Chen Y.-P., Hsu M.-C, Chien C.S., *J. Chromatogr.A* 1994, vol. 672, pp. 135-140.
90. Weinberger R., Lurie I.S., *Analyt Chem*, 1991, vol.63, no. 8, pp. 622-627.

ГЛАВА 7

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

7.1. О колонках для ВЭЖХ

В настоящее время в контрольно-аналитических лабораториях, занимающихся проблемами химико-аналитического определения наркотических и допинговых средств, редко приходится сталкиваться с задачами самостоятельного приготовления узких фракций сорбентов и заполнения высокоэффективных колонок. Существует значительное число фирм и иных организаций, вполне удовлетворительно решающих проблемы поставки достаточно высококачественных колонок для ВЭЖХ, уже заполненных разнообразными сорбентами, позволяющими успешно решать весьма широкий круг аналитических проблем. Поэтому в настоящей книге мы не приводим подробные описания процессов приготовления узких фракций адсорбентов, необходимых для ВЭЖХ, и способов заполнения ими колонок.

Приготовление колонок для ВЭЖХ с частицами сорбента размером от 3 до 12 мкм долго считалось труднопреодолимой проблемой. Так как при измельчении любых твердых тел резко возрастает их поверхность, мелкие частицы приобретают способность заряжаться электрически и слипаться в трудно разрушаемые комочки либо отталкиваться друг от друга с образованием неравномерно распределенных пустот.

Как правило, в колонке для ВЭЖХ, заполненной традиционным методом засыпки в сухом виде и уплотнения постукиванием, после того как через неё пропускали растворитель, адсорбент уплотнялся с образованием пустот в начале колонки. При этом форма пиков получалась неправильной, а эффективность колонки – низкой.

Разработка суспензионных методов приготовления колонок позволила резко увеличить эффективность колонок и использовать сорбенты с размером частиц 10 мкм и меньше. Однако суспензионный метод до сих пор отработан еще не до конца, так что существует множество его вариантов, каждый из которых имеет свои особенности. В общем этот процесс заключается в том, что суспензию адсорбента в подходящем растворителе фильтруют через фильтр, установленный в пустой колонке, формируя упорядоченный слой сорбента, обеспечивающий эффективное разделение при ВЭЖХ. По окончании останавливают поток растворителя, дают давлению упасть до нуля, готовую колонку устанавливают в хроматограф и прокачивают через нее рабочий растворитель до установления равновесия, после чего колонка готова к работе.

При всей кажущейся несложности процесса суспензионного заполнения колонок для ВЭЖХ при этом всегда возникает ряд вопросов. Какой растворитель взять для приготовления суспензии? Какую концентрацию суспензии использовать? Как лучше диспергировать сорбент? Какой формы и объема применить резервуар для суспензии?

Какой насос лучше использовать для подачи растворителя? Какое направление потока растворителя выбрать и какой взять растворитель? Какое давление использовать и сколько растворителя подавать? Сколько времени снижать давление? Как выравнивать слой сорбента и устанавливать соединительные фитинги и фильтры? На каждый из этих вопросов существует ряд ответов, а выбор удачной комбинации из всех вариантов всегда обусловлен не только собственным опытом экспериментатора, но и определенными общими представлениями, литературными данными и, наконец, имеющимся в наличии оборудованием [1–3].

Надо также учитывать тот факт, что фирмы, производящие сорбенты и заполненные ими колонки, не заинтересованы в разглашении своих секретов приготовления сорбентов и заполнения колонок. Следует с осторожностью относиться к «чудодейственным» жидкостям для приготовления суспензий обращенно-фазовых и некоторых других сорбентов, составы которых не раскрываются фирмами-изготовителями. Утверждения об «универсальности» этих жидкостей для любого обращенно-фазового сорбента и о получении якобы гарантированно высокоэффективных колонок являются не более чем рекламой, нередко весьма далекой от реальных результатов, которые удастся получить. Воспроизвести такие результаты обычно бывает достаточно затруднительно.

7.2. Оценка качества колонок для ВЭЖХ

Новые колонки испытывают с целью оценки их качества на модельных смесях веществ и на стандартных растворителях. Для испытания колонок с силикагелем с привитыми фазами «нитрил» и «диол» рекомендуется применять в качестве подвижной фазы смесь растворителей гексан-изопропанол (100:2 по объему), вводя пробы 0,5%-ного раствора *o*-крезола и фенола в подходящем растворителе.

Для испытания колонок с обращенно-фазовыми сорбентами (C_2 , C_8 и C_{18}) рекомендуется применять смеси метанол-вода или ацетонитрил-вода (70:30 по объему) в качестве растворителей (подвижных фаз) и пробы 0,5%-ного раствора толуола и *n*-ксилола в метаноле или в ацетонитриле в качестве тестовых веществ. Если компоненты пробы элюируются из колонки слишком быстро (для обращенно-фазовых сорбентов с малым содержанием привитой неподвижной фазы), следует применять элюент с соотношением компонентов 50:50.

Новая колонка, как правило, содержит растворитель, использованный при ее заполнении и отличающийся по составу от растворителя, используемого при испытании колонки. Поэтому новую колонку устанавливают в хроматограф и подают подвижную фазу со скоростью 1 мл/мин (для колонок диаметром 4,6 мм). Время, в течение которого устанавливается равновесие колонки с новым растворителем, определяется по стабильности нулевой линии прибора и по постоянной величине параметров удерживания хроматографируемых веществ. Это время обычно составляет 1–2 ч. После установления равновесия вводят несколько раз испытательную смесь и регистрируют ее хроматограммы.

При рассмотрении полученных хроматограмм обращают внимание на форму полученных пиков. Пики должны быть достаточно симметричными без размытых передних или задних фронтов («хвостов»). Недопустимо раздвоение пиков – это свидетельство наличия каналов или пустот в колонке. Коэффициент асимметрии пиков на 1/10 их

Pilus-test®

Новейшие Медицинские Технологии



117418, Москва, ул. Цюрупы. Д.3. Тел.: +7 (495)129 5109. www.pilus.ru

АНАЛИЗ ВОЛОС
на содержание
наркотических средств

высоты долж
ют постоянст
величин свид
эффективн
валентной тес
в продаже сор
ния колонок у
тической тар
дартной коло
5,5 до 11 тыс.
зерна 5 мкм [

7.3. Апп жидкост

Высокоэф
специальных
для этого про
подвижной ф
возможность
заданной про
процессе хром
коряет процес
жидкостной х
разных принц
вообразные д
и обработки п
наиболее част

Системы п
фазы. Надеж
можно лишь
требованиям.
В настоящее в
ию «для жид
ны подвергати
от взвешенны
ию) и форми

Тщательно
систему являе
нарушать рабо
ной фазы. Тве
роб. Кроме т
то приводит
фильтры явля
хроматографа
конструкции

высоты должен составлять для колонок хорошего качества 0,8–1,3. Далее проверяют постоянство времен удерживания веществ на хроматограммах: постоянство этих величин свидетельствует об установлении равновесия в колонке. Расчет параметров эффективности колонки (числа теоретических тарелок и приведенной высоты, эквивалентной теоретической тарелке) проводят по обычным формулам. Для имеющихся в продаже сорбентов среднего качества при хорошо подобранной методике заполнения колонок удается получить значения приведенной высоты, эквивалентной теоретической тарелке, от 3 до 6, что соответствует числу теоретических тарелок для стандартной колонки длиной 25 см от 4 до 8 тыс. при величине зерна сорбента 10 мкм, от 5,5 до 11 тыс. при величине зерна 7,5 мкм и от 8 до 16 тыс. для сорбента с величиной зерна 5 мкм [4–9].

7.3. Аппаратура для высокоэффективной жидкостной хроматографии

Высокоэффективная жидкостная хроматография осуществляется с применением специальных хроматографических систем и приборов, включающих все необходимые для этого процесса элементы. В их число входят устройства для подготовки и подачи подвижной фазы (растворителей и их смесей). Эти устройства также обеспечивают возможность осуществления градиентного элюирования посредством изменения по заданной программе состава подаваемого в хроматографическую колонку элюента в процессе хроматографического эксперимента, что во многих случаях существенно ускоряет процесс хроматографического анализа. Далее системы для высокоэффективной жидкостной хроматографии включают жидкостные насосы различной конструкции и разных принципов действия, высокоэффективные хроматографические колонки и разнообразные детектирующие системы, включающие также устройства для регистрации и обработки получаемых хроматограмм. Ниже коротко описаны принципы действия наиболее часто применяемых систем.

Системы подготовки растворителей и создания градиентов состава подвижной фазы. Надежное функционирование современного жидкостного хроматографа возможно лишь в том случае, когда применяемый растворитель отвечает определенным требованиям. Все применяемые растворители должны обладать достаточной чистотой. В настоящее время выпускаются растворители особого качества, имеющие квалификацию «для жидкостной хроматографии». Тем не менее применяемые растворители должны подвергаться предварительной обработке, включающей тщательное освобождение от взвешенных твердых частиц фильтрованием, удаление растворенных газов (дегазацию) и формирование градиента состава подвижной фазы.

Тщательное фильтрование растворителей перед их подачей в хроматографическую систему является абсолютно необходимым. Возможные механические примеси могут нарушать работу применяемого насоса, что приведет к непостоянству скорости подвижной фазы. Твердые частицы могут повредить уплотнения насоса и устройства для ввода проб. Кроме того, твердые частицы могут накапливаться на входном фильтре колонки, что приводит к постепенному повышению ее гидравлического сопротивления. Поэтому фильтры являются неотъемлемым элементом в системе подачи элюента жидкостного хроматографа. Обычно они выполняются из пористой нержавеющей стали и по своей конструкции могут быть погружены в резервуар с растворителем на приемной трубке

насоса либо могут быть установлены в ином месте на линии подачи растворителя. Размер пор фильтра обычно составляет 2–5 мкм.

Растворитель, предназначенный для использования в высокоэффективной жидкостной хроматографии, должен быть предварительно профильтрован через обычный стеклянный фильтр для удаления более крупных механических примесей.

Растворенный в подвижной фазе воздух нарушает работу насосов и детекторов. Вакуум, возникающий в цилиндре насоса возвратно-поступательного действия в период всасывания может приводить к образованию воздушных пузырей, нарушающих нормальную работу клапанов насоса, так что фактическая скорость подачи элюента оказывается меньше установленного значения. Более того, в этом случае усиливается пульсация давления подвижной фазы на выходе насоса. При поступлении подвижной жидкой фазы из колонки, где давление высоко, в детектор, где давление близко к атмосферному, также могут возникать пузырьки газа. Постепенное накопление таких газовых пузырей в детекторе и их удаление оттуда с потоком подвижной фазы приводит к резкому усилению шумов детектора и к значительным искажениям нулевой линии на хроматограмме.

Дегазацию растворителя можно осуществить путем резкого понижения давления в системе подачи элюента, как в приборе Дюпон 830, или путем выдерживания растворителя под вакуумом водоструйного насоса в отдельном сосуде с магнитной мешалкой, или при помещении сосуда в ультразвуковую баню. Неплохого результата можно достичь, пропуская через сосуд с элюентом инертный газ. Полного удаления из растворителя растворенных газов можно достичь путем отгонки примерно 1/3 объема подготавливаемого растворителя при атмосферном давлении или под вакуумом. Рекомендуется проводить дегазацию чистых растворителей до составления их смесей, так как при дегазации возможно изменение их состава.

Для изменения состава подвижной фазы в ходе хроматографического опыта применяются различного типа устройства для создания градиента. При этом используют три основных подхода: градиент состава подвижной фазы можно создавать на стороне низкого давления (до поступления подвижной фазы в насос), на стороне высокого давления (после насоса) или при использовании шприцевого насоса. В первом случае формирование градиента осуществляется с помощью специальных клапанных устройств, управляемых особой электронной схемой либо микропроцессором и обеспечивающих подачу двух или нескольких растворителей в форме импульсов с заданным соотношением их частот или объемов. Каждый растворитель при этом подается из отдельного сосуда, а относительная длительность импульсов соответствует желаемому соотношению скоростей подачи каждого из компонентов. Потоки разных растворителей смешиваются в специальной смесительной камере с магнитной мешалкой. После смешения подготовленная подвижная фаза поступает к насосу высокого давления. При этом рекомендуется заполнять резервуары для растворителей элюентами, состав которых соответствует начальному и конечному составу элюента в предполагаемом хроматографическом опыте. Так, например, если предполагается использовать градиентное элюирование с изменением концентрации водно-метанольной смеси от 20 до 70% метанола, то более предпочтительно заполнить резервуары хроматографа водно-метанольными смесями с 20 и 70% метанола и проводить градиентное элюирование от 0 до 100% содержания второго компонента.

Если градиент формируется на стороне высокого давления, то хроматограф должен иметь два или более насоса высокого давления по числу растворителей, используемых

Тип системы для формирования градиента	
Системы низкого давления	
Системы высокого давления	
Формирование градиента в цилиндре шприцевого насоса	

Устройства для элюирования небольших количеств образцов. Включает в себя...

в составе подвижной фазы. Каждый компонент смешанной подвижной фазы подается отдельным насосом с самостоятельным электронным или микропроцессорным управлением. Программа управления всеми насосами обеспечивает постоянную суммарную скорость подачи элюента в течение всего хроматографического эксперимента. В то же время скорость подачи каждого из компонентов смешанной подвижной фазы должна изменяться в соответствии с заданной программой. Поток растворителя от каждого насоса направляется в смесительную камеру и далее в устройство для ввода проб и в хроматографическую колонку.

Самый простой, но, по-видимому, наименее точный способ создания градиента состава подвижной фазы заключается в формировании градиента в цилиндре шприцевого насоса. Этот способ позволяет создавать ступенчатый градиент. Порции подвижной фазы с последовательно изменяющимся составом помещают в цилиндр шприцевого насоса при его зарядке. При тщательной работе можно избежать значительного перемешивания отдельных порций подвижной фазы. В рабочем цикле насоса порции подвижной фазы со ступенчато изменяющимся составом вытесняются в колонку в обратной последовательности. Некоторые особенности различных систем создания градиента сопоставлены в табл. 7.1.

Сопоставляя положительные и отрицательные стороны систем создания градиента на стороне высокого и низкого давления, можно сделать следующие заключения. Системы высокого давления довольно просты и устойчивы в работе. Они не требуют очень тщательного освобождения применяемых растворителей от растворенных газов и позволяют довольно легко переходить от работы с микроколонками к работам полупрепаративного и препаративного масштаба.

Таблица 7.1. Сравнительные характеристики систем для создания градиента состава подвижной фазы

Тип системы для формирования градиента	Точность поддержания градиента в начале и в конце хроматографического опыта	Возможность работы с микроколонками	Стоимость	Точность поддержания скорости подвижной фазы
Системы низкого давления	Высокая	Низкая	Умеренная	Высокая
Системы высокого давления	Высокая при работе со шприцевыми насосами; низкая при работе с поршневыми и плунжерными насосами	Умеренная	Высокая	Умеренная
Формирование градиента в цилиндре шприцевого насоса	Низкая	Высокая	Низкая	Высокая

Устройства для смешения компонентов обычно представляют собой сосуды относительно небольшого объема, снабженные магнитной мешалкой. Иногда эти устройства дублируются. При недостаточно эффективной работе смесительного устройства в колонку поступает подвижная фаза с неконтролируемым, неопределенным составом, что влечет за собой плохую воспроизводимость времен удерживания и значительное увеличение шумов детектора.

При работе с микроколонками приходится применять смесители с объемом около 0,1 мл. Попытки применять в этом случае смесители с объемом около 1,0–1,5 мл приводят к значительным искажениям профиля получаемого градиента. Это легко объяснить, если учесть, что для нормальной работы колонки диаметром 1 мм нужно обеспечить расход подвижной фазы около 30 мкл/мин. В этом случае растворитель в смесителе объемом 1,5 мл будет полностью заменен только через 30–50 мин.

Системы для создания давления подвижной фазы. В большинстве современных приборов для высокоэффективной жидкостной хроматографии скорости подвижной фазы составляют 0,1–10 мл/мин, а рабочие давления на входе в колонку достигают 1000 кг/см² и более.

Для этой цели в настоящее время применяют шприцевые нагнетающие устройства, системы с пневматическим усилением давления и поршневые и плунжерные насосы возвратно-поступательного действия.

Принцип действия шприцевых насосов ясен из их наименования. Цилиндр шприцевого насоса может иметь объем от 2,0–2,5 мл до 0,5 л и более. Его поршень продвигается с помощью винтового привода с синхронным или шаговым электродвигателем, управляемым компьютером. Наиболее совершенные шприцевые насосы обеспечивают подачу растворителя со строго постоянной скоростью от 0,1 до 10 мл/мин. Давление на входе в колонку при этом зависит от ее гидравлического сопротивления и может изменяться в диапазоне 200–300 кг/см². Общее количество растворителя соответствует объему цилиндра и обычно является достаточным для проведения от одного до десяти хроматографических анализов. После каждой такой серии анализов необходимо вновь заполнять шприц новой порцией растворителя. В большинстве случаев это не вызывает серьезных затруднений в повседневной работе, за исключением тех случаев, когда оказываются недопустимыми значительные потери времени и затраты растворителей, неизбежные при частых переходах от одной подвижной фазы к другой.

Сходными по принципу действия являются появившиеся несколько позже системы подачи подвижной фазы с пневматическим умножением давления. В таких системах вытесняющий жидкую фазу поршень малого диаметра продвигается с помощью поршня значительно большего диаметра, приводимого в движение давлением газа, сжатого до 3–6 кг/см² (азота, воздуха и т.п.). В связи с тем что сечение газового поршня много больше, чем сечение жидкостного поршня, можно обеспечить давление подвижной фазы на входе в колонку до нескольких сотен кг/см² при относительно низком давлении газа над газовым поршнем.

Давление, развиваемое таким насосом, оказывается строго постоянным при любых изменениях гидравлического сопротивления колонки. Однако воспроизводимость давления относительно невысока. Для того чтобы при работе с таким насосом добиться воспроизводимых значений параметров удерживания, необходимо обеспечить строго постоянное гидравлическое сопротивление применяемой колонки и поддерживать строго постоянными температуру колонки и вязкость подвижной фазы на всем протяжении хроматографического эксперимента. Эти особенности системы подачи подвижной фазы с пневматическим умножением давления затрудняют проведение экспериментов с градиентным элюированием и к тому же, как и их шприцевые аналоги, требуют большого количества растворителя для промывки насоса при замене подвижной фазы. Однако такие насосы проще в изготовлении и менее дороги, чем шприцевые насосы прямого действия и такой же вместимости. Кроме того, дополнительными достоинствами таких

насосов являются отсутствие каких-либо флуктуаций давления и скорости подаваемой подвижной фазы, относительно простая конструкция и высокая надежность в работе.

Тем не менее наиболее совершенными и чаще всего применяемыми в настоящее время в жидкостной хроматографии являются поршневые или плунжерные насосы возвратно-поступательного действия. Уже в восьмидесятые годы XX столетия такими насосами снабжались более 85% всех приборов для высокоэффективной жидкостной хроматографии, выпускавшихся ведущими приборостроительными фирмами во всем мире.

В этих насосах нагнетаемая жидкость заполняет цилиндр насоса в такте всасывания и вытесняется поршнем или плунжером в линию подачи подвижной фазы в такте нагнетания. Возвратно-поступательное движение поршня обеспечивается с помощью электродвигателя и кулачкового или кривошипно-шатунного механизма. Теория таких насосов хорошо разработана в течение многих столетий их использования в технике и детально описана в курсах теоретической механики и гидравлики. В соответствии с этой теорией величина объемной скорости подаваемой насосом жидкости определяется тремя факторами: диаметром поршня, амплитудой возвратно-поступательного движения и частотой движения поршня.

Насосы возвратно-поступательного действия обеспечивают постоянную скорость потока подвижной фазы вне зависимости от изменений гидравлического сопротивления колонки. Наибольшее давление, которое могут развивать такие насосы, составляет 500–800 и даже 1000 кг/см². Эта величина ограничивается только качеством уплотнений поршня. Такие величины давления вполне достаточны для подавляющего большинства областей применения ВЭЖХ. Воспроизводимость объемной скорости нагнетаемой жидкости, в общем, также оказывается достаточно удовлетворительной. Однако принципиальным недостатком насосов возвратно-поступательного действия является то обстоятельство, что жидкость ими подается не непрерывным потоком, а в форме последовательных импульсов. Перемещение поршня насоса возвратно-поступательного действия с кулачковым или кривошипно-шатунным приводом пропорционально синусу угла поворота приводного вала. Таким образом, при первом полуобороте приводного вала подача растворителя сначала растет от нуля до некоторого максимального значения и вновь падает до нуля. Во время второй половины оборота, когда новая порция жидкости засасывается в цилиндр насоса, подвижная фаза в хроматографическую систему не поступает.

Таким образом, одноцилиндровый возвратно-поступательный насос подает жидкость в форме синусоидальных импульсов с перерывами между ними длительностью в половину каждого оборота приводного вала.

Для того чтобы уменьшить это нежелательное явление, применяют двухцилиндровые насосы, в которых каждый цилиндр работает со сдвигом фаз движения на 180°. Это позволяет избежать полного прерывания подачи жидкой фазы в тактах всасывания, но не исключает периодического уменьшения потока от максимальной величины до нуля и нового его возрастания от нуля до максимального значения. Однако такие нерегулярности потока подвижной жидкой фазы могут быть устранены с помощью специальных демпферных устройств различного типа. Некоторые из таких устройств описаны далее.

Многочисленные усовершенствования в конструкции насосов возвратно-поступательного действия позволили существенно уменьшить флуктуации скорости подачи нагнетаемой жидкой фазы, свойственные одноцилиндровым и двухцилиндровым на-

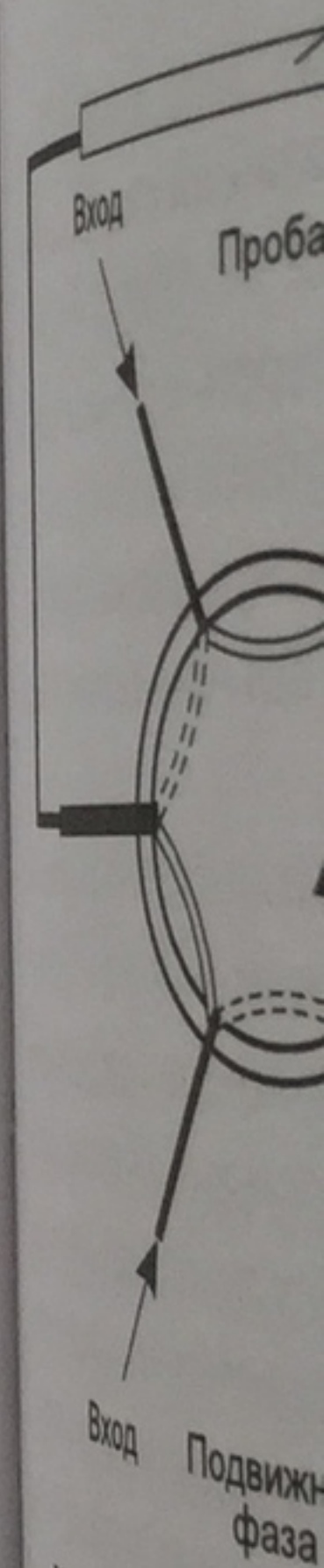
сосам этого типа. Так, например, применение кулачков со специально рассчитанным профилем позволяет снизить уровень флуктуаций скорости подачи до 3% для двухцилиндрового насоса и до примерно 0,2% для трехцилиндрового. В то же время насосы с двумя или тремя цилиндрами более дороги, более сложны в ремонте и обслуживании и более чувствительны к загрязнениям клапанов.

В современных приборах для жидкостной хроматографии обычно применяют сапфировые плунжеры и сапфировые шаровые клапаны, опирающиеся на тщательно обработанные сапфировые седла. Этот материал вполне устойчив по отношению ко всем органическим жидкостям и разбавленным водным растворам, используемым в качестве элюентов в жидкостной хроматографии. В некоторых моделях аппаратуры используют также миниатюрные пластинчатые клапаны, несколько более устойчивые по отношению к незначительным механическим загрязнениям.

В общем, в большинстве случаев вполне достаточно использовать для высокоэффективной жидкостной хроматографии двухцилиндровый возвратно-поступательный плунжерный насос с оптимизированной формой кулачков привода и с регулированием производительности путем изменения частоты движения плунжера. Такие насосы вполне достаточны для получения надежных и хорошо воспроизводимых результатов хроматографических экспериментов.

Демпфирующие устройства. Для того чтобы уменьшить колебания давления и нарушения равномерности подачи подвижной фазы при использовании возвратно-поступательных насосов, применяют демпфирующие устройства различного типа. Простейшими из них являются свернутые в спираль упругие трубки из нержавеющей стали или жесткой бронзы наподобие трубок Бурдона, применяемых в манометрах. Такие трубки прямоугольного (щелевидного) сечения включают параллельно или последовательно в линию подачи растворителя непосредственно после насоса и перед устройством для ввода проб хроматографа. Часто бывает достаточно для этой цели установить сразу после насоса манометр с упругой трубкой достаточно большого объема, однако следует принять специальные меры для полного заполнения трубки такого манометра жидкой фазой. Во многих случаях в системах подачи подвижной жидкой фазы используют упругие элементы сильфонного типа, помещенные в сосуды высокого давления, заполненные подвижной фазой. Сами эти упругие элементы заполняют относительно легко сжимаемой жидкостью (керосином, машинным маслом и др.). Кроме этого, в современных приборах применяют достаточно сложные и эффективные системы электронного контроля давления и скорости подачи, управляемые микропроцессорами или компьютерами.

Устройства для ввода проб. В принципе ввод проб в жидкостной хроматографии может осуществляться путем прокалывания эластичной мембраны иглой специального микрошприца. Такой способ ввода проб достаточно удобен до давлений порядка 100 кг/см². При более высоких давлениях часто используют способ ввода пробы с прерыванием потока подвижной фазы. В этих случаях подачу подвижной фазы приостанавливают на время ввода пробы путем остановки насоса или путем перекрывания специального клапана. При этом избыточное давление на входе в колонку падает до нуля всего за несколько секунд, после чего открывают колонку и вводят пробу прямо на входной фильтр колонки с помощью микрошприца или микропипетки. Затем вновь закрывают колонку и возобновляют подачу подвижной фазы. Такой способ ввода проб можно применять до давлений порядка 800–1000 кг/см² без каких-либо особых ослож-



Крановые системы... Однако потери... дополнительных дета... повторении эт... Дополнитель... хроматографическ... в колонке и быстро... Этим объясняетс... жидкостной хромато... шанные устройств... жидкостного объема... пробную трубку или... выполненных шест...

нений. Однако потери времени, связанные с отвинчиванием и завинчиванием входных соединительных деталей колонки причиняют известные неудобства. Кроме того, при частом повторении этих операций довольно быстро происходит износ соответствующих деталей. Дополнительным недостатком такого способа ввода проб является расширение хроматографических пиков, особенно заметное для компонентов, слабо удерживаемых в колонке и быстро элюируемых из нее.

Этим объясняется тот факт, что в современных приборах для высокоэффективной жидкостной хроматографии для ввода проб используют специальные крановые или клапанные устройства. Обычно эти устройства снабжаются петлеобразными трубками известного объема. Поток подвижной фазы направляется в колонку через эту пробовывборную трубку или минуя ее с помощью применяемых в этих устройствах тщательно выполненных шестиходовых кранов очень малого объема (рис. 7.1).

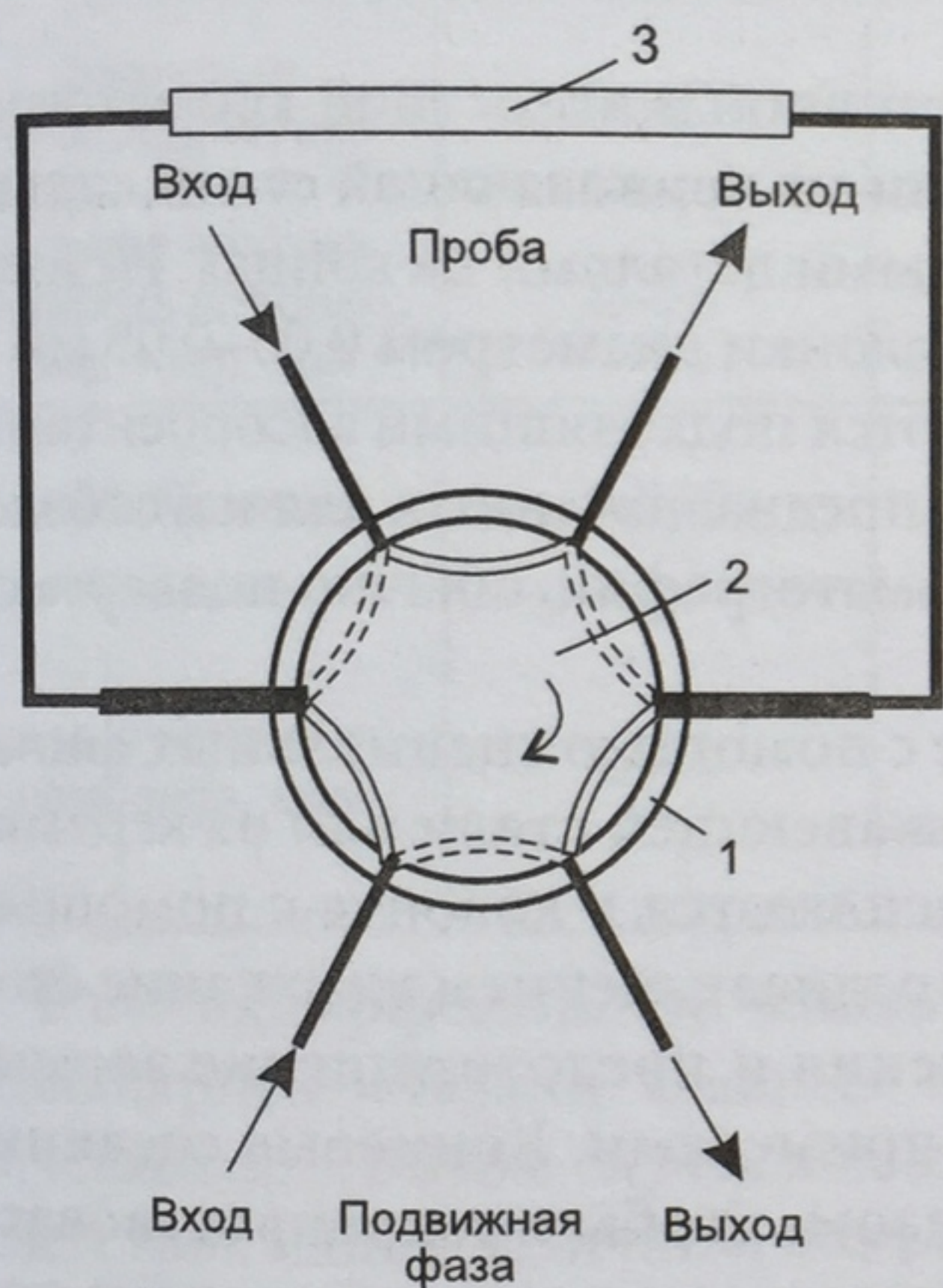


Рис. 7.1. Дозировочный кран для ввода проб: 1 – корпус крана; 2 – пробка крана; 3 – дозирочная емкость (петля)

Крановые системы обеспечивают очень высокую воспроизводимость объема вводимых проб. Этот объем можно изменять от 10 мкл до 10 мл путем простой замены дозирующих трубок. Крановые системы хорошего качества могут устойчиво работать до давления порядка 800 кг/см^2 . Обычно эти устройства не требуют ремонта даже после ввода нескольких тысяч проб. В том случае, если сжатие трущихся деталей этих крановых устройств будет таким, чтобы обеспечить их устойчивую работу только до $350\text{--}400 \text{ кг/см}^2$, то их срок службы значительно увеличивается. В то же время такое давление вполне достаточно для большинства хроматографических анализов.

Разработаны устройства такого типа с пневматическим или электромеханическим приводом, позволяющие осуществлять автоматический ввод более 100 проб в соответствии с заранее заданной программой. Обычно эти устройства способны полностью выполнить все необходимые при вводе проб операции: промывку дозирующей трубки, заполнение ее подлежащей анализу жидкой пробой и ввод этой пробы в хроматографическую колонку. Такие системы довольно дороги и требуют квалифицированного обслуживания, поэтому их использование оправдано только в тех случаях, когда необходимо анализировать большое число проб, сходных по своему составу.

В некоторых наиболее современных хроматографах для ввода проб используется дополнительный насос, управляемый компьютером и обеспечивающий ввод проб по его командам. Более подробное описание таких систем выходит за пределы задач данной книги.

Колонки. Наиболее важным элементом любой системы для высокоэффективной жидкостной хроматографии являются разделяющие колонки. Их размеры и конструкции весьма разнообразны в зависимости от той или иной конкретной модификации применяемого метода и от особенностей решаемой аналитической задачи. Типичные характеристики колонок, широко применяемых в настоящее время и имеющих перспективы применения в ближайшем будущем, приведены в табл. 7.2. В последнем столбце этой таблицы приведены также данные колонок для жидкостной хроматографии, применявшихся до того, как была разработана концепция высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В большинстве случаев колонки для высокоэффективной жидкостной хроматографии представляют собой прямые толстостенные трубки из нержавеющей стали, стекла или подходящих пластмасс с винтовыми соединительными деталями на концах. Применяются также стеклянные и кварцевые капиллярные колонки диаметром 0,03–0,05 мм и длиной от 100 мм до 40–60 м и более. Колонки заполняются подходящими адсорбентами, как описано выше. Внутреннюю поверхность трубок, предназначенных для изготовления колонок для высокоэффективной жидкостной хроматографии, обычно подвергают специальной полировке.

Слой адсорбента обычно удерживается в колонке с помощью специальных фильтрующих элементов, выполненных из пористой нержавеющей стали или из керамики с размером пор 0,45–2,0 мкм. Эти фильтры закрепляются в колонке с помощью винтовых соединительных деталей и имеют своим предназначением удержание слоя адсорбента в колонке при больших перепадах давления и предотвращение засорения слоя адсорбента какими-либо механическими примесями. Концевые соединительные детали колонок выполняются таким образом, чтобы воспрепятствовать дополнительному расширению хроматографических зон при входе в колонку и при выходе из нее.

Время эксплуатации колонок в жидкостной хроматографии редко превышает 1 месяц.

Отработанные металлические колонки редко наполняют адсорбентом повторно и часто предпочитают просто выбрасывать. Это, естественно, увеличивает расходы на проведение хроматографических работ и стоимость обслуживания хроматографических приборов. Для того чтобы избежать этого, часто применяют колонки с заменяемыми вкладышами, заполненными адсорбентом. Эти детали, изготовленные из стекла или из подходящей пластмассы, при необходимости могут быть легко заменены, так что основные металлические колонки могут работать значительно более длительное время. Часто во избежание загрязнения основного адсорбционного слоя нежелательными примесями, присутствующими во вводимых пробах или в подаваемой подвижной фазе, перед основной колонкой устанавливают добавочную короткую трубку с адсорбентом (форколону), надежно защищающую основной адсорбент от возможных загрязнений.

Таблица 7-2. Характеристики основных типов колонок для высокоэффективной жидкостной хроматографии

Параметр	Аналитические колонки	Высоко- скоростные аналитические колонки	Микро- колонки	Капиллярные колонки	Препаративные колонки	Колонки для обычной жидкостной хроматографии
Длина колонки, мм	50–250	50	150	От 100 мм до 60 м	100–300	100–500
Внутренний диаметр, мм	3–6	3–6	1,0	0,03–0,05	10–60	10–60
Скорость потока подвижной фазы, мл/мин	1,5	2,5	0,1	0,01	30	0,01–1,0
Давление на входе, кг/см ²	50–500	100–400	50–200	50–200	10–400	0,01–0,1
Полная эффективность колонки, тыс. теор. тар	3–20	3–5	5–8	5–100	2–10	0,1–1,0
ВЭТТ, мм	0,015	0,01	0,015	0,01	0,015	0,1–0,5
Размер частиц адсорбента, мкм	3–10	3–7,5	3–7,5	Диаметр капилляра 0,03–0,05 мм и менее	5–10	30–100

В высокоэффективной жидкостной хроматографии находят применение также и капиллярные колонки. Главным фактором, определяющим расширение хроматографических зон, в этом случае является сопротивление массопередаче в подвижной фазе вследствие малой величины коэффициентов диффузии в жидкости. Было показано теоретически, что для получения высоких значений эффективности в жидкостной хроматографии необходимо использовать капиллярные колонки диаметром меньше, чем 50 мкм [10–12]. Поэтому в настоящее время в жидкостной хроматографии применяют капиллярные колонки диаметром 30–65 мкм и длиной от 20–100 см до 50–60 м. Накопленные данные о применении капиллярных колонок в высокоэффективной жидкостной хроматографии с большой обстоятельностью рассмотрены в монографиях [8, 9].

Расчеты показывают, что капиллярные колонки достаточной длины и малого диаметра могут обеспечить в жидкостной хроматографии полную эффективность разделения в несколько сотен тысяч теоретических тарелок, что намного превышает возможности наполненных колонок. В настоящее время в жидкостной хроматографии применяются стеклянные капилляры малого диаметра и гибкие кварцевые капилляры с наружным полиимидным покрытием. Обычно в жидкостной хроматографии используют капиллярные колонки с иммобилизованными неподвижными фазами на стенках или со слоями адсорбентов, также нанесенными на стенки или сформированными из материала самого капилляра с помощью тех или иных технологических приемов. Во многих случаях такие слои готовят из инертных твердых носителей с нанесенными на них подходящими неподвижными фазами. Процедуры, используемые для нанесения таких сорбционных слоев, описаны в работах [10–20].

Важной характеристикой капиллярных колонок является отношение их диаметра к величине частиц применяемого сорбента. Нежелательно, чтобы это отношение было больше 10, так как в этом случае становится возможным вымывание частиц сорбента потоком подвижной фазы. Эффективность колонок с внутренним диаметром 50–70 мкм и длиной 10–65 м может достигать 70 тыс.т.т. и более.

Применение капиллярных колонок позволяет резко сократить расход подвижной фазы. При использовании капиллярных колонок объемная скорость подвижной фазы обычно не превышает 10–30 мкл/мин. Однако становятся существенно более жесткими требования к устройствам для ввода проб и к детектирующим системам. Объем вводимых жидких проб не должен превышать 1–3 мкл, и примерно таким же должен быть объем рабочих ячеек детектора. Некоторые детекторы такого типа описаны ниже. Кроме того, при этом повышаются требования ко всем линиям подачи подвижной фазы и к конструкции соединительных узлов хроматографа с тем, чтобы в максимальной степени исключить возможность внеколоночного размывания хроматографических зон и соответствующего снижения эффективности разделения.

При соединении нескольких хорошо заполненных мелкозернистым адсорбентом колонок относительно небольшой длины в жидкостной хроматографии была достигнута очень высокая эффективность разделения. Так, например, при анализе смесей обычного бензола и пердеитеробензола, а также при анализе смесей диазепамов была достигнута эффективность до 7×10^6 т.т. при использовании десяти последовательно соединенных колонок длиной 50 см каждая, заполненных силикагелем с величиной зерна 5 мкм [21, 22].

Было показано, что при использовании капиллярных колонок диаметром 10–50 мкм можно достичь эффективности разделения от $1,25 \times 10^6$ до 5×10^6 т.т. [23, 24]. Капиллярные колонки диаметром 10 мкм позволяют достигать эффективность более 50 000 т.т. при длине колонки менее 1 м [25]. Время удерживания разделяемых соединений в таких колонках составляет всего лишь 8–10 сек и даже менее.

Таким образом, рассмотренные примеры ясно демонстрируют возможности достижения очень высокой эффективности разделения в жидкостной хроматографии. Однако получение такой высокой эффективности требует очень высокого качества всей хроматографической системы и большого опыта экспериментатора. По-видимому, именно этим фактом можно объяснить то обстоятельство, что в настоящее время подавляющее большинство анализов с помощью метода жидкостной хроматографии выполняется с использованием коммерчески доступных приборов, в которых применяются колонки длиной 3–25 см и диаметром 2–6 мм. Такие колонки позволяют получить эффективность разделения до 3–20 тыс. т. т., что во многих случаях оказывается вполне достаточным.

Детекторы для высокоэффективной жидкостной хроматографии. Применяемые в современной жидкостной хроматографии детекторы должны обеспечить регистрацию изменений некоторых свойств подвижной фазы, покидающей хроматографическую колонку, связанных с элюированием из колонки разделенных компонентов анализируемой пробы. Такими свойствами могут быть оптические характеристики в УФ-, ИК- или видимом спектральном диапазоне, показатель преломления, флуоресцентные свойства, электропроводность, диэлектрическая проницаемость, способность к окислению или восстановлению и др.

Детекторы для жидкостной хроматографии могут быть разделены на две категории: универсальные и селективные. Детекторы первой категории могут регистрировать наличие в элюате любых веществ, кроме компонентов подвижной фазы, безотносительно

к наличию или отсутствию у них каких-либо специфических индивидуальных свойств. Такие детекторы находят широкое применение в синтетической органической химии, в нефтехимии, биохимии, фармации, медицине и др.

Селективные детекторы способны регистрировать элюирование из колонки веществ, интересующих экспериментатора и обладающих какими-либо специфическими свойствами по сравнению с другими компонентами, присутствующими в элюате. К этой категории относятся, например, флуоресцентные и электрохимические детекторы. Эти детекторы широко используются при анализе следовых компонентов фармацевтических препаратов, наркотиков или биогенных аминов в биологических пробах и в объектах окружающей среды.

Детекторы, применяемые в настоящее время в жидкостной хроматографии, конечно, не обладают всеми характеристиками идеального детектора. Набор детекторов, доступных в жидкостной хроматографии, дает возможность выполнять много интересных и важных определений. Ассортимент доступных детекторов непрерывно пополняется по мере появления новых разработок.

Каждый детектор характеризуется уровнем собственных шумов, который может различаться по крайней мере на один порядок величины для детекторов, работающих на основе одних и тех же принципов, но произведенных разными производителями. Второй очень важной характеристикой любого детектора является величина дрейфа его сигнала (то есть дрейф нулевой линии). Этот параметр определяют как смещение нулевой линии за определенный промежуток времени при отсутствии каких-либо элюируемых из колонки веществ (за 1 час или 1 сутки и т.п.). Этот параметр также может различаться на один порядок величины и более у детекторов одного типа, но выпущенных разными производителями.

Для успешного использования того или иного детектора весьма важен такой показатель, как собственный объем рабочей ячейки детектора. Этот объем не должен превышать 0,1 объема элюента, в котором элюируется из колонки первый пик, представляющий интерес с точки зрения выполняемого анализа. Это весьма существенно в случае быстро протекающих анализов, выполняемых на колонках длиной 3–5 см, заполненных адсорбентом с величиной зерна 3–5 мкм. Кроме того, этот показатель весьма важен при работе с колонками малого диаметра (1 мм и менее) и с капиллярными колонками. Во многих случаях, когда хроматографическое разделение выполняется на капиллярной колонке или на наполненной колонке малого диаметра порядка 25–50 мкм, ячейкой детектора служит участок кварцевого или стеклянного капилляра. При этом кварцевые капилляры на длине 3–5 мм освобождают от лакового внешнего покрытия, предохраняющего капилляр от атмосферных влияний. Часто первые пики в высокоэффективной жидкостной хроматографии элюируются в очень малом объеме подвижной фазы порядка 30–50 мкл. Это определяет желательный объем ячейки детектора не более 3–5 мкл.

Линейный диапазон сигнала детектора должен быть достаточно широким, для того чтобы обеспечить возможность регистрации как преобладающих компонентов пробы, так и следовых примесей в анализируемом объекте. Приемлемая ширина линейного динамического диапазона детектора должна быть порядка 10^5 . Наконец, весьма важной характеристикой детектора должна быть малая чувствительность к небольшим изменениям температуры, флуктуациям скорости подвижной фазы и изменениям в ее составе. Последнее качество особенно важно при проведении хроматографических анализов в условиях градиентного элюирования.

Наиболее важные типы детекторов, применяемых в настоящее время в высокоэффективной жидкостной хроматографии, кратко охарактеризованы ниже [26, 27].

Фотометрический детектор, работающий в УФ- и видимом спектральном диапазоне. Проточные фотометры, работающие в УФ-диапазоне, по-видимому, являются в настоящее время наиболее распространенными детектирующими устройствами, применяемыми в жидкостной хроматографии. Это связано с их относительно небольшой стоимостью в сочетании с высокой чувствительностью и надежностью в работе. Эти детекторы могут проработать более 6000 часов. С другой стороны, этим детекторам присуща относительно малая чувствительность к флуктуациям температуры, скорости подвижной фазы и изменениям ее состава. Принципиальная схема простейшего фотометрического детектора представлена на рис. 7.2.

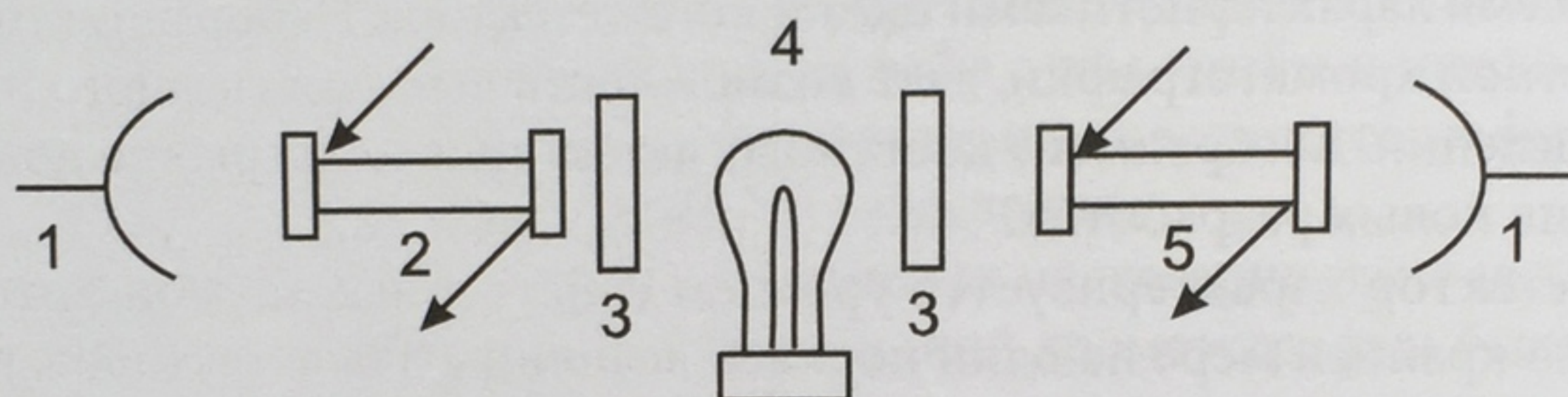


Рис. 7.2. Принципиальная схема УФ-фотометрического детектора: 1 – фотоприемники; 2 – рабочая кювета; 3 – оптические фильтры; 4 – ртутная лампа; 5 – сравнительная кювета

Поток элюента протекает через рабочую ячейку, а через сравнительную ячейку направляется поток чистой подвижной фазы. Источником УФ-света служит ртутная лампа высокого или среднего давления, дающая интенсивное УФ-излучение в спектральных линиях линейчатого спектра. Свет с нужной длиной волны выделяется с помощью подходящих оптических фильтров. Ртутные лампы низкого давления излучают более 90% световой энергии в спектральной линии с длиной волны 254 нм, что позволяет отказаться от использования оптических фильтров. В ряде случаев в фотометрическом детекторе используют излучение с длиной волны 280 нм, возбуждаемое с помощью подходящих люминесцентных экранов. Во многих конструкциях фотометрических детекторов такое излучение используют во вспомогательном канале детектирования, облегчающем идентификацию неизвестных соединений. Имеются и другие лампы, в сочетании с подходящими оптическими фильтрами излучающие УФ-свет с другими длинами волн (206, 214, 229, 280, 313, 334 и 365 нм). Такие лампы могут бесперебойно работать от 500–600 до 6000 часов.

Многие органические вещества интенсивно поглощают УФ-излучение с длиной волны 254 нм. К ним относятся все ароматические и многие гетероциклические соединения, карбонильные соединения и многие другие. Таких соединений много среди контролируемых наркотических и допинговых средств. Для детектирования таких соединений применение простых, недорогих и надежных фотометрических детекторов вполне оправдано. Чувствительность этих детекторов достаточно высока, а шумы и дрейф незначительны. Ячейки этих детекторов могут иметь собственный объем от 0,2–2 мкл для работы с микроколонками до 10 мкл и более для проведения более крупномасштабных препаративных разделений. Все эти обстоятельства сделали фотометрические детекторы одними из наиболее часто применяемых в высокоэффективной жидкостной хроматографии в настоящее время.

Наиболее совершенные УФ-детекторы содержат набор подходящих фотодиодов, образующих так называемую диодную матрицу или диодную линейку. УФ-излучение с непрерывным спектром (например, излучение дейтериевой лампы) после выхода из рабочей ячейки детектора разделяется на отдельные лучи с той или иной длиной волны, каждый из которых направляется на свой отдельный фотодиод. Таким образом, по существу, фиксируется УФ-спектр каждого вещества, элюируемого из хроматографической колонки. В наиболее совершенных современных хроматографах используются диодные линейки, содержащие 32, 64, 128 и более (до 500–600) фотодиодов.

В сочетании с многоканальными усилителями или с компьютерами такие детекторы позволяют одновременно регистрировать целый набор хроматограмм, зафиксированных в разных длинах волн. УФ-детектор с диодной матрицей представляет собой наибольшее из известных приближение к универсальному детектору, позволяющему получить очень большой объем информации о качественном и количественном составе анализируемой смеси в результате всего лишь одного хроматографического эксперимента. Такие детекторы довольно дороги, однако они оказываются исключительно полезными при анализе смесей, сложных по своему составу. Можно ожидать, что в ближайшем будущем сфера их использования в жидкостной хроматографии будет все более и более расширяться [26, 27].

Спектрофотометрические детекторы. Эти детекторы более сложны по устройству, чем фотометрические. Их детальное описание можно найти в специальных руководствах по спектральному анализу и по жидкостной хроматографии. Эти детекторы могут регистрировать изменения интенсивности поглощения УФ-излучения в диапазоне длин волн от 190 до 360 нм и видимого света в спектральной области выше 360 нм. Этот диапазон охватывает почти все органические соединения, являющиеся объектами хроматографического анализа и разделения.

Спектрофотометрические детекторы разной конструкции различаются по их спектральному диапазону, уровню шумов и скорости дрейфа. Время работы ультрафиолетовых ламп, являющихся наиболее важными компонентами таких детекторов, к сожалению, относительно невелико и составляет 300–500 ч и лишь в редких случаях достигает 700 ч.

В зависимости от выбранной длины волны спектрофотометр может работать как универсальный или селективный детектор. Так, при работе на длине волны 190 нм этот детектор позволяет регистрировать сахара, жиры, простые и сложные эфиры, синтетические поверхностно-активные вещества, полиэтиленгликоли и др. Все эти соединения почти не поглощают УФ-излучение с длиной волны более 210 нм. Таким образом, при работе в данном спектральном диапазоне этот детектор функционирует как универсальное детектирующее устройство. В диапазоне больших длин волн тот же детектор работает как селективный, позволяя регистрировать вещества, поглощающие УФ-излучение в определенных спектральных диапазонах, характеристичных для соединений с теми или иными особенностями молекулярной структуры.

Многие спектрофотометрические детекторы позволяют записывать полный спектр раствора элюируемого из колонки вещества в подвижной фазе при прерывании ее потока на время снятия спектра или даже в процессе ее движения. Полученные спектры во многих случаях позволяют идентифицировать многие неизвестные компоненты анализируемых смесей, хотя в целом идентификационные возможности спектрофотометрического детектора считаются не слишком высокими. Тем не менее полученная таким путем информация позволяет вывести определенные заключения о числе компонен-

тов в составе зарегистрированного пика, выявить присутствие тех или иных примесей, оценить чистоту изучаемых соединений, установить длину волны, соответствующую максимуму поглощения света для данного конкретного вещества и, наконец, идентифицировать пики на хроматограмме.

Наиболее совершенные спектрофотометрические детекторы, управляемые компьютером, позволяют автоматически изменять по заданной программе рабочую длину волны в процессе хроматографического опыта по мере выхода из колонки различных компонентов изучаемой пробы. Таким образом обеспечивается максимально возможная чувствительность детектирования каждого из компонентов изучаемой пробы, представляющего интерес.

Следует отметить, что использование спектрофотометра, работающего на длине волны 190 нм в качестве универсального детектора, затрудняется очень ограниченным выбором растворителей, прозрачных в этом спектральном диапазоне. В обращенно-фазовой хроматографии при длине волны менее 200 нм можно применять только воду и ацетонитрил после их тщательной очистки. Такие особо чистые растворители довольно дороги, а очистка растворителей в лабораторных условиях достаточно затруднительна. Таким образом, чаще спектрофотометрические детекторы используются в жидкостной хроматографии как селективные регистрирующие устройства.

Как фотометрическое, так и спектрофотометрическое детектирование может осуществляться как прямое и косвенное. Вещество, элюируемое из колонки, в первом случае регистрируется по увеличению поглощения света с повышением его концентрации в элюате, а во втором случае – по уменьшению светопоглощения, когда в результате выхода из колонки вещества, не поглощающего в данном спектральном диапазоне, в элюате уменьшается содержание поглощающего свет компонента подвижной фазы.

Такой компонент может присутствовать в подвижной фазе изначально, либо может быть введен в подвижную фазу после колонки и перед ее поступлением в ячейку детектора.

ИК-Фурье спектрометры в качестве детекторов для высокоэффективной жидкостной хроматографии. Этот способ детектирования является одним из самых совершенных в жидкостной хроматографии. К сожалению, его использование ограничивается его несовместимостью с большинством растворителей, применяемых в качестве подвижных фаз. Тем не менее этот способ детектирования может быть использован для регистрации элюируемых из хроматографической колонки соединений по полосам поглощения с наибольшей мольной экстинкцией. При этом такой способ детектирования осуществляется при использовании некоторых специфических растворителей (преимущественно хлорированных углеводородов. Однако, если для детектирования используются полосы поглощения карбонильных групп или непредельных связей, оказывается возможным применять довольно широкий круг растворителей различной полярности (от гексана до ацетонитрила). Этот детектор имеет ряд существенных преимуществ перед другими детектирующими системами. Если детектирование проводится по полосам поглощения связи С–Н, то детектор работает как универсальный, позволяя регистрировать почти все органические соединения. С другой стороны, этот детектор может использоваться как высокоселективный, позволяющий выявлять соединения, содержащие группы атомов, обеспечивающие сильное поглощение излучения в ИК-спектральном диапазоне (группы ОН, С=О, С=С и др.). Сигнал этого детектора почти не зависит от молекулярной массы детектируемого соединения, что существенно облегчает количественную интер-

претацию хроматограмм. Чувствительность этого детектора достигает 10^{-7} – 10^{-8} г/мл. Большая часть описанных в литературе современных ИК-детекторов основана на применении диодных матриц, как и в УФ-детекторах, и работает в сочетании с электронно-вычислительными машинами.

Рефрактометрические детекторы. Непрерывная регистрация изменений показателя преломления подвижной фазы на выходе хроматографической колонки может быть осуществлена с помощью проточных рефрактометров. Это устройство, по-существу, представляет собой один из наиболее универсальных детекторов для жидкостной хроматографии, известных в настоящее время. Современные проточные рефрактометры способны зарегистрировать наличие в подвижной фазе любого вещества, в самой малой степени отличающегося от подвижной фазы по величине показателя преломления. Рефрактометрический детектор может работать в сочетании с любой подвижной фазой в очень широком диапазоне скоростей. Этот детектор, достаточно надежный в работе, предъявляет не слишком высокие требования к чистоте применяемых растворителей. Он обладает достаточно широким линейным динамическим диапазоном, однако его чувствительность относительно невысока, так что он является, по-существу, универсальным детектирующим устройством умеренной чувствительности. При рациональном выборе растворителя предельно детектируемая концентрация вещества может составлять 5×10^{-7} г/мл, что близко к чувствительности ИК-Фурье детектора.

К сожалению, этот детектор не может применяться при проведении градиентного элюирования. Кроме того, при использовании этого детектора для обеспечения высокой чувствительности необходимо с высокой точностью поддерживать постоянную температуру. Для снижения шума и дрейфа этого детектора необходимо поддерживать постоянную температуру ячеек детектора и элюента с точностью 10^{-3} – 10^{-4} град. Рефрактометрический детектор чувствителен к флуктуациям скорости потока подвижной фазы, так что при его использовании применение эффективных демпфирующих устройств в системе подачи растворителей является совершенно необходимым.

Применение рефрактометрических детекторов в аналитической практике в настоящее время ограничивается их относительно невысокой чувствительностью.

Флуоресцентные (флуориметрические) детекторы. Эти детекторы используют способность многих органических и неорганических соединений флуоресцировать под действием различных излучений. Флуоресцентные свойства, то есть способность испускать свет под действием УФ-излучения или видимого света, присущи многим соединениям, имеющим важное значение в медицине, фармации, анализе пищевых продуктов, в контроле наркотических и допинговых средств и в анализе загрязнений окружающей среды. Многие лекарственные препараты, включая стероиды, витамины, красители, полициклические ароматические соединения и другие важные соединения могут определяться с очень высокой чувствительностью путем измерения их флуоресцентных свойств.

Интенсивность флуоресценции веществ зависит от интенсивности излучения, вызывающего флуоресценцию, и от квантового выхода процесса возбуждения молекул. Для обеспечения высокой чувствительности флуоресцентных детекторов применяются достаточно мощные источники возбуждающего излучения (газоразрядные лампы и лазеры). Чувствительность флуоресцентных детекторов с лазерным возбуждением позволяет регистрировать присутствие некоторых флуоресцирующих соединений на уровне 10^{-12} г и менее. Такая чувствительность на несколько порядков величины превышает чувствительность детекторов по светопоглощению. Некоторые современные флу-

флуоресцентные детекторы позволяют по усмотрению экспериментатора выбирать длину волны возбуждающего и испускаемого излучения, что предоставляет дополнительные возможности идентификации пиков на хроматограммах.

Обычно флуоресцентный детектор имеет проточную ячейку с двумя взаимно перпендикулярными оптическими каналами. Один из них служит для подвода возбуждающего излучения, а другой позволяет измерять интенсивность флуоресценции.

Чувствительность флуоресцентных детекторов может уменьшаться при увеличении концентрации изучаемого раствора вследствие явления внутреннего тушения флуоресценции. Поэтому, в основном, флуоресцентные детекторы применяются для определения следовых концентраций способных к флуоресценции соединений. Линейный диапазон этих детекторов достаточно широк (около 10^4), однако для некоторых соединений он может быть ограничен довольно узким диапазоном концентраций. Поэтому при использовании такого детектора требуется тщательное предварительное изучение его характеристик до проведения с его помощью количественных определений. При этом необходимо проверить отсутствие фоновой люминесценции и эффектов тушения излучения и, кроме того, провести градуировку детектора в области реальных концентраций для конкретных соединений, подлежащих количественному определению.

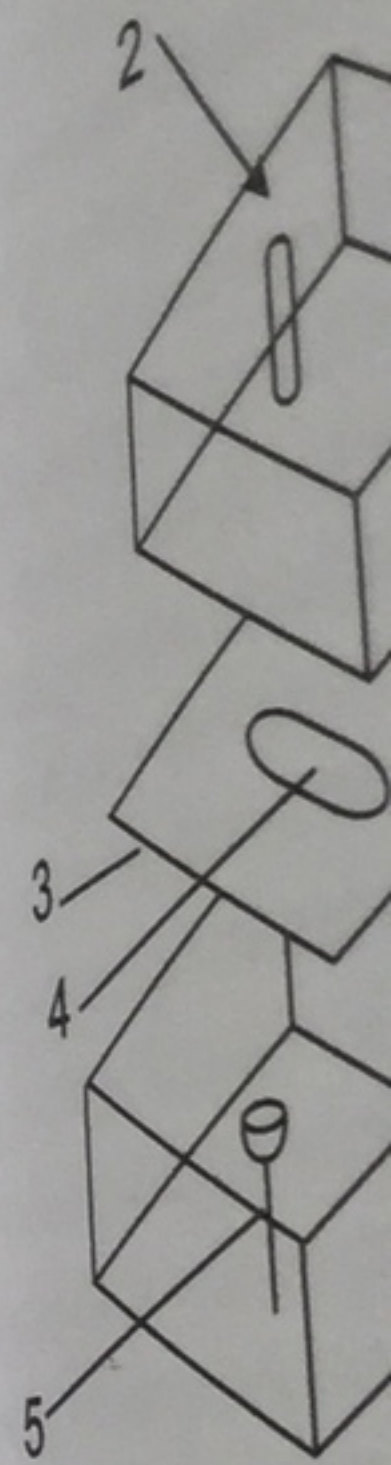
Сигнал флуоресцентных детекторов лишь в малой степени зависит от изменений температуры и давления. Эти детекторы могут быть использованы в условиях градиентного элюирования при условии, что применяемые растворители не флуоресцируют сами и не содержат флуоресцирующих примесей.

Некоторые вещества, не обладающие сами по себе способностью к флуоресценции, могут быть зарегистрированы этим детектором после перевода в флуоресцирующие производные, которые могут быть получены до проведения хроматографического разделения или после него с помощью реакций с подходящим флуорогенным реагентом [27, 28]. Так, например, амины и фенолы образуют флуоресцирующие производные с 5-диметиламино-1-нафтилсульфохлоридом, а аминокислоты после хроматографического разделения могут быть переведены в флуоресцирующие производные реакцией с флуорескамином [29]. Такие приемы позволяют существенно расширить возможности этого очень чувствительного и во многих случаях специфичного метода детектирования на многие важные группы соединений, не обладающих собственной способностью к флуоресценции. Таким образом, флуоресцентный детектор является одним из наиболее важных детектирующих систем в области медико-биологических исследований и контроля загрязнений окружающей среды.

Электрохимический детектор. Вещества, обладающие электрохимической активностью, то есть способные к электрохимическому окислению или восстановлению, могут быть с успехом зарегистрированы с помощью электрохимического детектора. Потенциал электрохимического окисления или восстановления изменяется в пределах от $-0,8$ В до $+1,2$ В. Вещества, содержащие фенольные, индольные или альдегидные группировки, способны окисляться при более низких потенциалах порядка $0,4-0,7$ В. Имеющие важное значение для биохимии катехоламины и 5-оксииндолы также могут окисляться в тех же условиях, тогда как кетоны и соединения, содержащие нитрогруппы, в этих условиях восстанавливаются.

Процессы окисления и восстановления веществ связаны с потерей или приобретением электронов, что приводит к появлению малых электрических токов, которые далее усиливаются и регистрируются с помощью соответствующих электронных устройств.

Ячейки большинства
являются собой миниатюрные
электродом, выполнен
ется вне рабочей ячей
всего лишь 2-4 мм



Этот детектор
обладающих д
вые смеси с ра
высокую селек
ния 5-оксиин
минов - 0,5-0
тивным соеди
предельно об
(5-20) $\times 10^{-12}$ г
химический
их производ
и лекарственных
ческих амин
соединений
торов этого
соединений
Электро
ных фаз. Д
чистые сол
ной жидко
гать очист
В конст
других ти
дами, рту
струкции.

Ячейки большинства широко используемых электрохимических детекторов представляют собой миниатюрные камеры с расположенным в их центре единственным рабочим электродом, выполненным из стеклоуглерода. Второй сравнительный электрод помещается вне рабочей ячейки на ее выходе (рис. 7.3). Рабочая площадь электрода составляет всего лишь 2–4 мм².

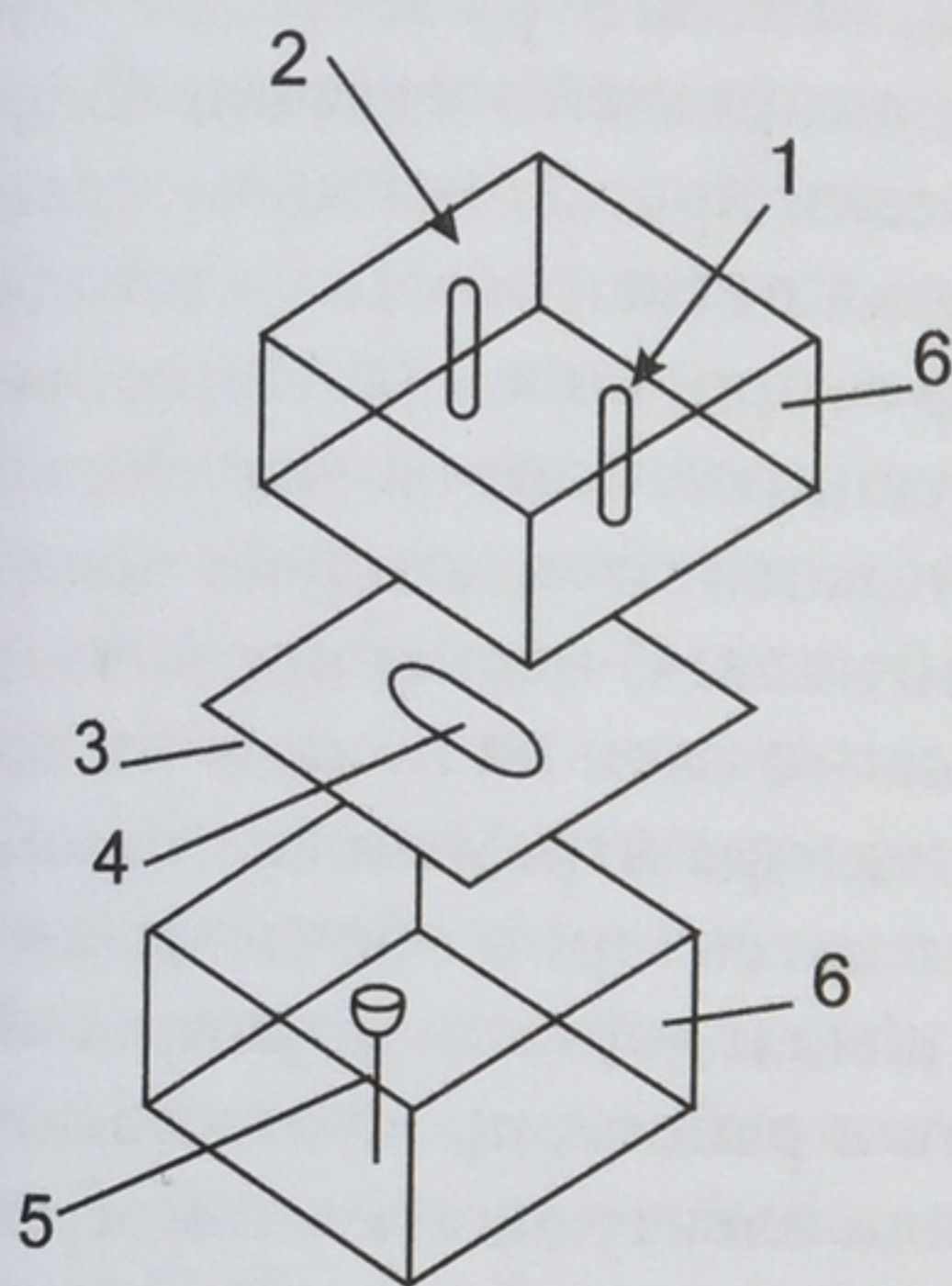


Рис. 7.3. Конструкция электродной ячейки электрохимического детектора: 1 – вход элюата из колонки; 2 – выход элюата (к электроду сравнения); 3 – фторопластовая прокладка; 4 – рабочая камера ячейки; 5 – рабочий электрод; 6 – элементы корпуса ячейки

Этот детектор работает в потоке водных или водно-органических подвижных фаз, обладающих достаточной электропроводностью (буферные растворы, водно-спиртовые смеси с растворенными солями и т.п.). Электрохимический детектор проявляет высокую селективность при низких электродных потенциалах. Так, для детектирования 5-оксииндолов наилучшее значение потенциала равно 0,5–0,55 В, для катехоламинов – 0,5–0,7 В, а для пептидов – 0,9–1,2 В. По отношению к электрохимически активным соединениям чувствительность электрохимических детекторов очень высока: предельно обнаруживаемая концентрация катехоламинов и 5-оксииндолов не превышает $(5-20) \times 10^{-12}$ г вещества в пробе. Помимо двух упомянутых групп соединений, электрохимический детектор находит применение при определении серотонина, ацетилхолина, их производных и метаболитов, нейропептидов, многих других биологически активных и лекарственных веществ. Он также может применяться при анализе фенолов, ароматических аминов, тиоспиртов, аскорбиновой кислоты, мочевой кислоты и многих других соединений в условиях электрохимического окисления. Возможно применение детекторов этого типа для детектирования хинонов, нитросоединений, металлоорганических соединений и многих других веществ.

Электрохимический детектор очень чувствителен к чистоте применяемых подвижных фаз. Для приготовления буферных растворов необходимо применять только очень чистые соли и высокочистую воду, специально предназначенную для высокоэффективной жидкостной хроматографии. Рабочие электроды необходимо периодически подвергать очистке и промывать смесью воды и спирта (1:1).

В конструкциях электрохимических детекторов применяются также рабочие ячейки других типов. В их числе можно упомянуть многоэлектродные, с трубчатыми электродами, ртутно-капельные и др. Описанные электрохимические детекторы по своей конструкции, рабочим характеристикам и условиям работы сходны с кулонометрическими

детекторами, хотя такие детектирующие системы применяются в жидкостной хроматографии в настоящее время много реже.

Электрокондуктометрический детектор. Этот детектор, применяемый, в основном, в области ионообменной и ионной жидкостной хроматографии, представляет собой кондуктометрическую ячейку, то есть камеру небольшого объема (менее 10 мкл), с двумя электродами, изготовленными из платины, золота, нержавеющей стали, титана или иного коррозионно устойчивого материала с хорошей электропроводностью. Часто электроды представляют собой просто отрезки проволоки диаметром 0,3–1,0 мм и длиной 1–3 мм. Эта ячейка включена в одну из ветвей моста Уитстона, что позволяет осуществлять измерение ее электрического сопротивления. Применяемые в настоящее время детекторы содержат соответствующие системы усиления и автоматической записи сигналов, а также компенсации фонового тока, который может в десятки и сотни раз превышать величину полезного сигнала. С целью исключить влияние электролиза и образования двойного электрического слоя на показания детектора применяют системы электрического питания детектора переменным током. Современные конструкции электрокондуктометрических детекторов обеспечивают их довольно высокую чувствительность порядка 10^{-8} – 10^{-9} г/мл и достаточно широкий линейный динамический диапазон (до 10^6). Устойчивость в работе, простота обслуживания и относительно невысокая стоимость обеспечили электрокондуктометрическому детектору широкое распространение при проведении хроматографических анализов. В ионной хроматографии этот детектор выполняет функции достаточно универсального средства регистрации хроматограмм.

Более подробные сведения об аппаратуре для жидкостной хроматографии можно найти в монографиях [30, 31]. В настоящее время для определения наркотических и допинговых средств в различных объектах находит широкое применение жидкостная хроматография с масс-селективными детекторами. Имеющие особое значение в современной аналитической технике масс-спектральные методы детектирования в сочетании с различными хроматографическими методами будут обсуждены подробно ниже.

7.4. Количественные измерения в хроматографии

Простейшим способом получения количественной информации является измерение высот пиков на хроматограмме. Высота пика пропорциональна наибольшей концентрации веществ в подвижной фазе при выходе хроматографической зоны из колонки. Поэтому она является мерой количества вещества. Однако помимо количества вещества высота пика тесно связана со скоростью испарения пробы, с характером размывания зоны в колонке, длительностью пребывания пробы в колонке, т. е. с величиной времени удерживания и т. п. Относительные изменения высоты пика вследствие случайных колебаний температуры и скорости подвижной фазы более чем в 2–3 раза превышают аналогичные изменения площади. Сообщают, что изменение температуры колонки на 1°C изменяет высоты пиков на 2,5–3 отн.% [32]. Поэтому использование высот пиков для количественных определений в настоящее время ограничивается сравнительно редкими случаями, когда требование быстроты анализа сочетается с возможностью поддержания строгого постоянства условий ввода пробы и проведения анализа. Определение состава смеси по высотам пиков используется также для ориентировочных определений, не требующих высокой точности.

Значительно более точные количественные данные могут быть получены посредством измерения площадей хроматографических пиков. Площадь пика определяется количеством вещества значительно более однозначно. Она сравнительно мало зависит от температуры колонки (изменяется на 0,3 отн.% на 1°C [33]), мало меняется при изменении скорости подвижной фазы, а также мало зависит от эффективности колонки и от времени пребывания вещества в ней.

Для определения процентного состава пробы в первую очередь необходимо определить площадь хроматографических пиков. Эта величина может быть определена или путем прямых измерений, или расчетом по формулам, связывающим величины линейных элементов хроматографического пика с его площадью. Для измерения площадей пиков применяли непосредственное ее измерение при помощи полярного планиметра (планиметрирование) [34], определение площади посредством взвешивания вырезанных из бумаги пиков [35], использование механических, электромеханических и электронных интегрирующих устройств [36] и др. В настоящее время в большинстве современных хроматографических приборов имеются достаточно совершенные электронные системы, автоматически осуществляющие расчет площадей пиков, введение корректирующих факторов, учитывающих индивидуальную чувствительность применяемых детектирующих систем к тем или иным компонентам анализируемой пробы и выполняющих расчеты количественного содержания ее отдельных компонентов. Тем не менее, ниже будут показаны простые приемы оценки площадей хроматографических пиков, позволяющие получить количественные соотношения определяемых компонентов анализируемых проб.

Методы непосредственного измерения площади применимы независимо от формы хроматографических пиков, однако точность их неодинакова.

Метод планиметрирования дает большие ошибки при определении площадей, меньших чем 100 мм^2 . Повторение измерений до 5–10 раз позволяет несколько повысить точность, но резко увеличивает длительность и трудоемкость обработки хроматограммы. Определение площадей взвешиванием вырезанных из бумаги хроматографических пиков сопряжено со значительными ошибками, связанными с неоднородностью толщины бумаги. Этот способ требует обязательного копирования хроматограммы, так как в противном случае она уничтожается. Точность обоих рассмотренных способов существенным образом зависит от субъективных факторов. Точность электронных интегрирующих устройств значительно выше, однако применение их может давать ошибки при наличии пиков, разделенных неполностью, а также в случаях, когда имеется дрейф нулевой линии.

Расчетные методы определения площадей пиков основаны на предположении о том, что хроматографический пик может с той или иной степенью точности аппроксимироваться кривой, допускающей простое аналитическое выражение площади через основные линейные элементы. Теория линейной неидеальной хроматографии указывает, что контур хроматографического пика во многих случаях с высокой степенью точности описывается кривой нормального распределения Гаусса [37–41].

Основными линейными элементами хроматографического пика являются: его высота h , то есть длина перпендикуляра, опущенного из точки пересечения касательных в точках перегиба на нулевую линию; ширина пика, a_p , которая может быть измерена, например, в середине высоты, $a_{1/2}$, на какой-либо иной доле высоты a_θ или между точ-

ками пересечения с нулевой линией касательных в точках перегиба, a_0 . Точное значение площади пика, описанного гауссовской кривой, выражается достаточно просто:

$$S = \sqrt{2\pi} \sigma h = 2,507 \sigma h \quad (7.1)$$

Величина $2,507 \sigma$ в полученном выражении равна ширине пика на уровне, равном $0,456$ полной высоты. Чаше ширину пика измеряют на середине высоты, где она равна $2,365\sigma$, так что произведение высоты пика на ширину в его середине дает величину, несколько меньшую его истинной площади. Однако, если площадь всех пиков хроматограммы рассчитывается одинаково, то это отклонение от истинной площади также будет одинаково и потому не окажет влияния на точность окончательного результата. Более того, из изложенного следует, что при расчете соотношения площадей пиков, описываемых гауссовскими кривыми, можно использовать вместо точных значений площадей величины произведений высот пиков на значения их ширины на любой доле их полной высоты, которая, однако, должна быть одинаковой для всех пиков данной хроматограммы.

В тех случаях, когда наблюдаются существенные отклонения формы пиков от пропорций кривой Гаусса, более точные результаты можно получить, аппроксимируя пик треугольником. Такой метод расчета, однако, не свободен от субъективных ошибок, связанных с неточностью проведения касательных к контуру пика. Ошибки определения площади пика могут быть обусловлены неточностью измерения его ширины и высоты. Погрешность определения этих величин связана как с погрешностью измерения, так и с некоторой неопределенностью в положении нулевой линии пика. При измерении очень узких пиков точность измерения их ширины становится весьма незначительной, соответственно оказывается малой и точность определения площадей. Широкие и низкие пики затрудняют точное определение положения нулевой линии, что вносит большую неопределенность в положение места измерения ширины пика. При этом незначительное изменение высоты, на которой определяется ширина пика, приводит к серьезным ошибкам измерения его ширины. В результате точность определения площади вновь оказывается низкой. Показано [41], что с наименьшей погрешностью может быть определена площадь пиков, имеющих отношение высоты к ширине на середине высоты, равное 3–5.

В большинстве случаев точность определения площади пиков ручными способами находится в пределах 1–3 отн.% [42, 43]. При очень тщательном выполнении измерений и строгом соблюдении постоянства условий хроматографического разделения удастся достичь точности 0,3–0,5 отн.% [44, 45].

В тех случаях, когда трудно избежать появления на хроматограмме очень узких или очень широких и низких пиков, целесообразно использовать предложенный в работах [46, 47] метод расчета, основой которого является предсказанная теоретически и подтвержденная экспериментально линейная зависимость стандартного отклонения хроматографического пика от полного времени удерживания при постоянных условиях хроматографического процесса. Отсюда следует, что площади пиков при расчете процентного содержания компонентов анализируемой смеси могут быть заменены пропорциональными им произведениями высоты на время удерживания, выраженное в единицах времени или длины диаграммной бумаги. Так как отрезки, соответствующие величинам времени удерживания, обычно значительно превышают величину ширины

пиков, этот метод обеспечивает значительное увеличение точности измерений. К сожалению, зависимость скорости размывания пиков от коэффициентов диффузии компонентов приводит к тому, что этот метод оказывается более точным, чем описанные ранее, лишь тогда, когда в анализируемой смеси присутствуют вещества, различающиеся по величине времени удерживания не более чем в 4–5 раз. Кроме того, точность метода заметно снижается при наличии колебаний температуры, скорости подвижной фазы и скорости движения диаграммной бумаги.

Существенным преимуществом последнего метода расчета является возможность применения его для раздельного определения содержания компонентов, пики которых перекрываются. В этих случаях обычно применение других методов расчета невозможно, и описанный метод, называемый методом Бартлета–Смита, оказывается буквально неоценимым [46].

Последним практически важным вопросом, который необходимо здесь рассмотреть, является определение площади пиков, не уложившихся полностью на диаграмме. Ранее хроматограммы, содержащие пики, выходящие за пределы диаграммы, за исключением случаев анализа очень малых примесей, считались браком и переснимались повторно. Однако показано [48–50], что, если имеется хроматографический пик, удовлетворяющий уравнению кривой Гаусса

$$y = h e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}} \quad (7.2)$$

и срезанный на высоте y_c , причем ширина его в месте среза $a_c = 2x_c$, то, выбрав произвольное сечение $a = 2x$ на высоте y (рис. 7.4), можно рассчитать параметры пика и его площадь по следующим формулам:

$$\sigma = 0,465 \sqrt{\frac{(x+x_c)(x-x_c)}{\lg \frac{y_c}{y}}} \quad (7.3)$$

$$\lg h = \lg y_c + 0,217 x_c^2 / \sigma^2$$

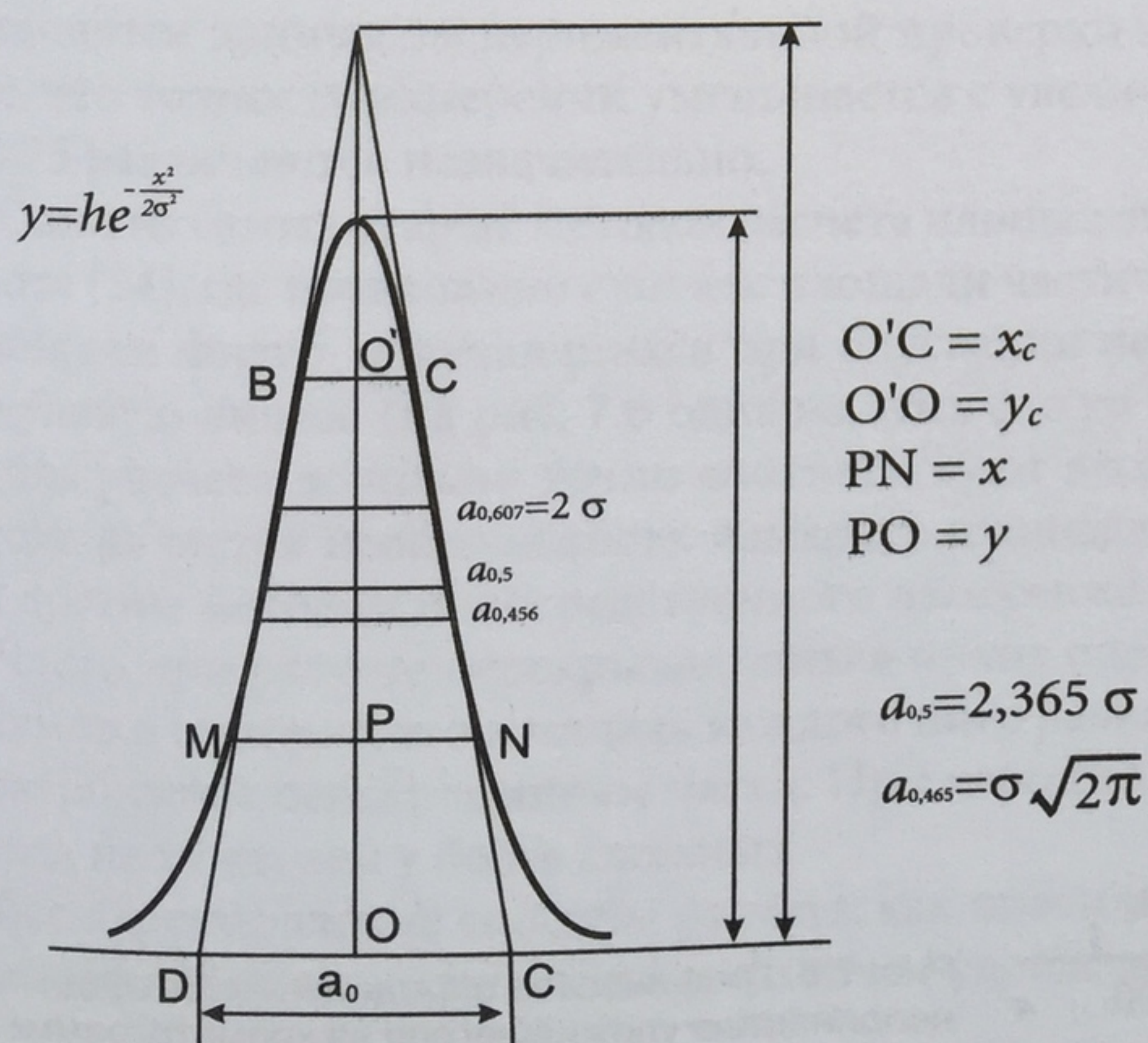


Рис. 7.4. Кривая Гаусса

$$S_0 = 2,507 \sigma h \quad (7.3)$$

Точность расчета по формулам (7.3) не зависит от высоты среза и составляет $\pm 5-6$ отн. % при изменении y_c вплоть до $0,05 h$. Еще менее зависит точность расчета от высоты произвольного нижнего сечения.

Формулы (7.3) дают истинное значение площади срезанного пика, поэтому площади полностью записанных пиков той же хроматограммы следует определять как произведение величины $a_{0,456}$ на высоту. Если желательно пользоваться произведениями $a_{1/2} h$, то коэффициент 2,507 в формуле (7.3) следует заменить на 2,365.

В практике экспериментальной работы при определении площади срезанного пика по формулам (7.3) важно знать, в какой мере рассчитываемый пик отвечает форме кривой Гаусса. Выяснить этот вопрос можно с помощью несложного графического построения, одновременно позволяющего существенно повысить точность определения площади срезанного пика. Для этого достаточно решить второе из уравнений (7.3) относительно $\lg y$ и вместо x_c подставить в него ширину пика $a=2x$. Полученное выражение

$$\lg y = \lg h - 0,0504 a^2 / \sigma^2 \quad (7.4)$$

в координатах a^2 и $\lg y$ есть уравнение прямой, отсекающей на оси ординат отрезок $\lg h$ и имеющей угловой коэффициент $-0,0504/\sigma^2$. По этим величинам легко определить σ и h и далее площадь пика по формуле (7.3). Практически на хроматограмме отмечают несколько произвольных точек контура срезанного пика, измеряют их расстояние от нулевой линии y , ширину пика a и строят график $a^2 - \lg y$. Проведение прямой по методу наименьших квадратов, усредняющее результаты нескольких измерений, существенно снижает ошибку расчета. Ход построения показан на рис. 7.5. В соответствии со сказанным ранее, точки ложатся на прямую и во многих случаях, когда имеет место общая асимметрия пика. Отклонения формы пика от гауссианы, обуславливающие большие ошибки в определении площади пиков, легко выявляются по резкому искривлению графика [50].

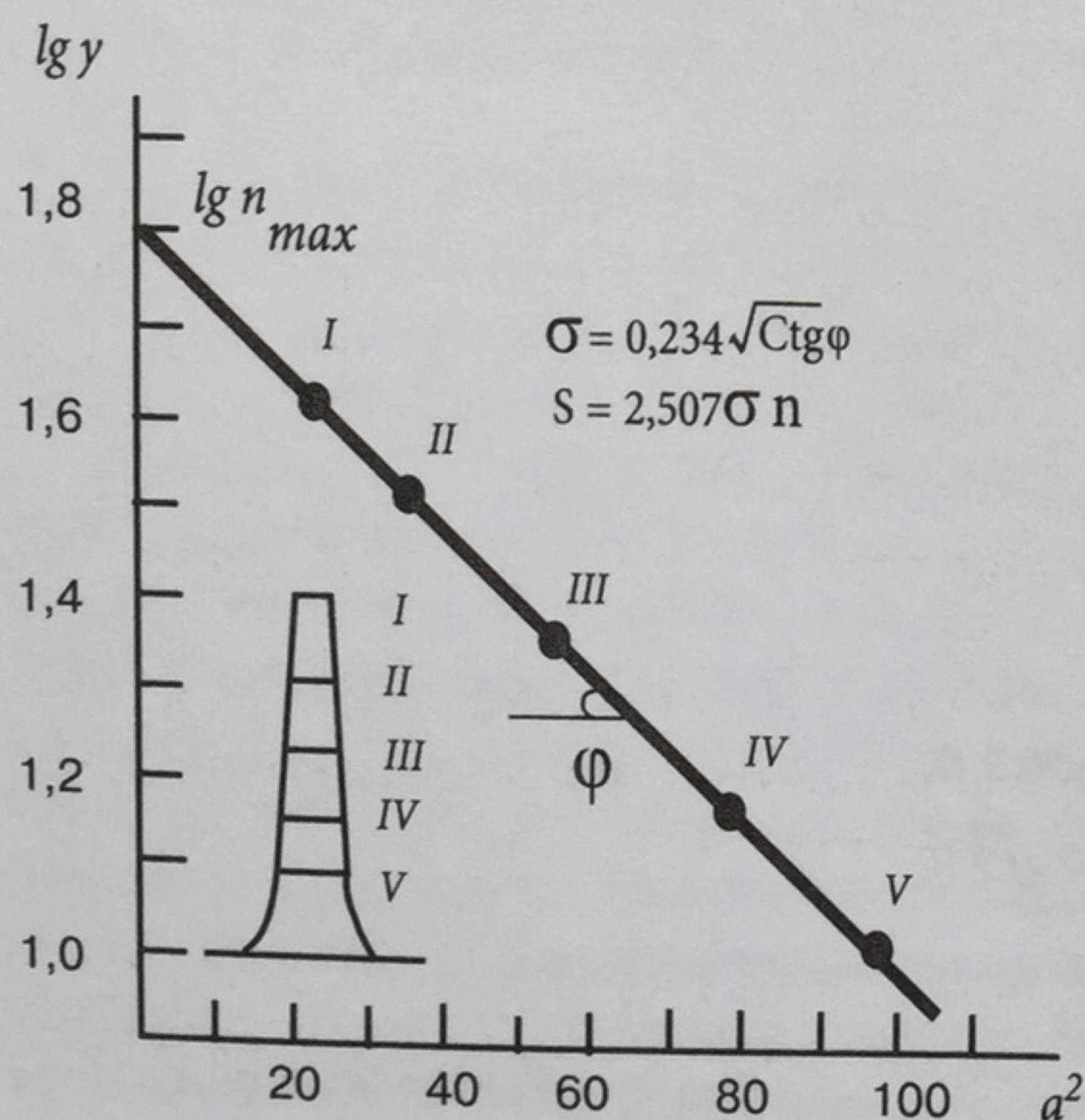


Рис. 7.5. Графическое определение площади пика, полностью уложившегося на хроматограмме

Возможность с достаточной точностью определять площадь срезанных пиков, помимо значительной экономии сил и времени, связанной с устранением необходимости повторной пересъемки хроматограмм, позволяет существенно повысить точность анализа смесей, содержащих резко различающиеся по своей концентрации компоненты, так как устраняет ошибки, связанные с неточностью масштабных коэффициентов и изменениями положения нулевой линии при переключении масштаба. При этом без снижения точности определения достигается более чем десятикратное увеличение диапазона определяемых концентраций.

7.5. Расчет площадей хроматографических пиков при их неполном разделении

Неполное разделение хроматографических зон приводит к изменению положения максимумов результирующей кривой и к увеличению высот перекрывающихся пиков.

Подробный анализ этого явления, проведенный в работах [46, 51–53 и др.], привел к следующим результатам.

Можно в этом случае воспользоваться вместо площадей пиков произведениями их высот на времена удерживания, как указано выше. Можно также вычислять вместо истинных площадей произведения высоты на значения ширины пика при 0,75 или даже 0,9 его полной высоты.

Полученные величины могут быть переведены в истинные площади умножением на коэффициенты, равные, соответственно, 1,650 и 2,710. При этом указывается, что значение h_i/h выбирается так, чтобы на выбранной высоте искажения формы кривой, вносимые соседним пиком, были невелики. Из формул (7.1) и (7.2) видно, что предложенный метод является частным случаем общей пропорциональности произведения ha_θ и площади при любой величине θ . Поэтому можно выбрать для данной хроматограммы удобную величину θ и, сохраняя ее для всех пиков постоянной, использовать для количественного расчета вместо площадей произведение ha_θ . В цитируемой работе приводятся данные экспериментальной проверки этого способа расчета, показывающие, что точность измерений уменьшается с увеличением θ , хотя ошибки при $\theta=0,5$ и $\theta=0,75$ различаются незначительно.

Один из самых старых методов расчета площадей неразделившихся пиков изложен в работе [54], где предложено считать площади частично разделившихся пиков равными площадям фигур, получающихся при опускании перпендикуляра из точки минимума на нулевую линию (на рис. 7.6 одна из этих фигур заштрихована). Результаты такого метода расчета довольно точно соответствуют весовому составу смеси. Недостатком метода является необходимость измерять площади полученных фигур планиметром или другим методом непосредственного измерения.

Часто при расчете перекрывающихся пиков опускают перпендикуляры из их максимумов и считают, что площадь каждого пика равна удвоенной площади его внешней, не затронутой перекрыванием части. При хорошей симметрии пиков точность этого метода не хуже, чем у более сложных.

Все перечисленные способы расчета, как правило, относятся к симметричным хроматографическим пикам, достаточно точно удовлетворяющим уравнению нормальной

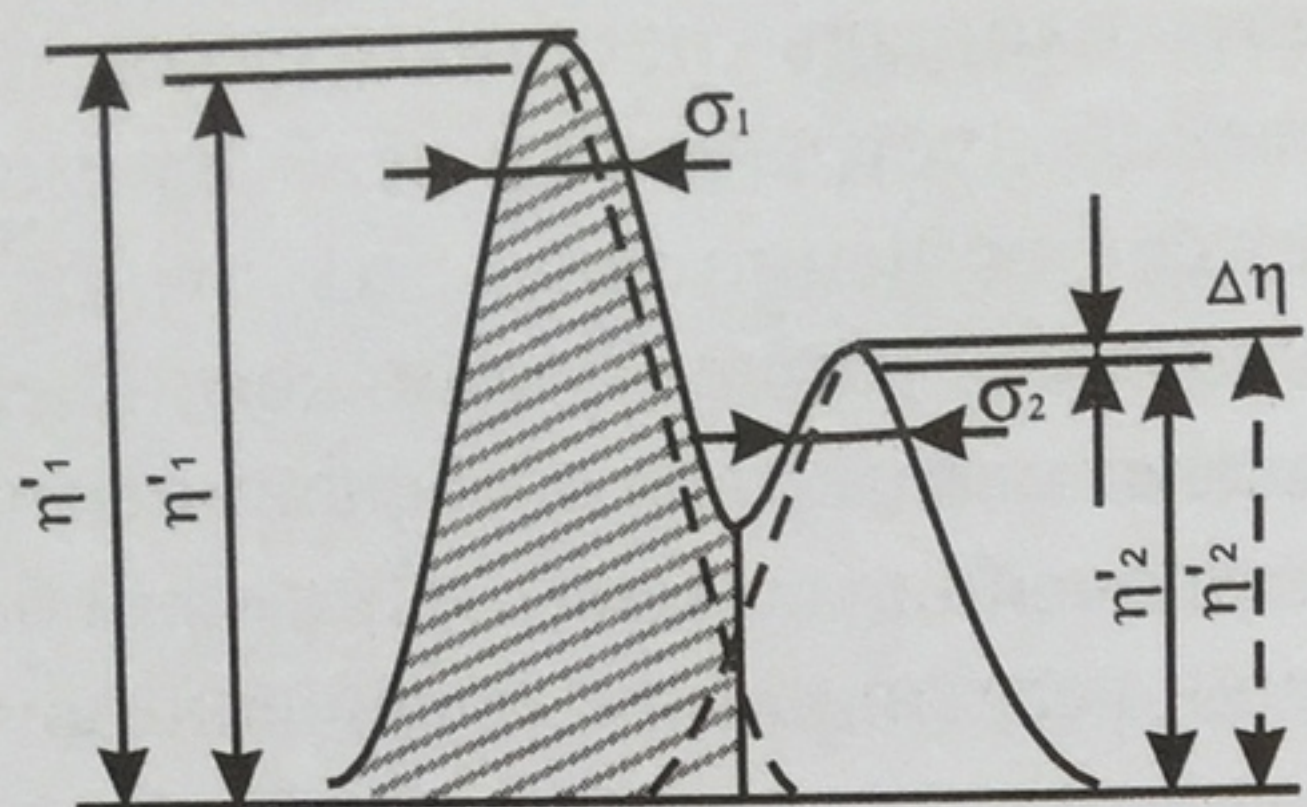


Рис. 7.6. Определение площадей полностью разделенных пиков

кривой. Площади перекрывающихся несимметричных пиков могут быть рассчитаны с использованием описанных методов только при отсутствии «хвостов» и при условии весьма незначительной асимметрии. В общем случае расчет перекрывающихся несимметричных пиков сложен и точность получающихся результатов незначительна.

Особым случаем расчета неразделившихся пиков является определение площади малого пика примеси, находящегося на пологом заднем фронте большого пика основного компонента, т. е. на его «хвосте» (рис. 7.7). В ряде работ [35, 55–57] показано, что в этом случае наиболее точные результаты получаются при непосредственном измерении площади малого пика, считая нулевой линией для него продолжение контура основного пика.

Ввиду того, что контур большого пика основного компонента в пределах меньшего можно приближенно считать прямой линией, этот случай тесно связан с проблемой определения площади пика, записанного при наличии значительного дрейфа, т. е. имеющего наклонную нулевую линию (рис. 7.7). В обоих случаях можно считать, что рассматриваемый пик является кривой Гаусса, записанной в косоугольной системе координат. Не вдаваясь в подробности, укажем, что в этом случае нас интересует та площадь пика, которую он имел бы в прямоугольных координатах, т. е. в отсутствие дрейфа или в отсутствие пика преобладающего компонента. Эта площадь равна произведению измеренной на хроматограмме высоты пика на проекцию его средней линии на направление, перпендикулярное высоте, как показано на рис. 7.7.

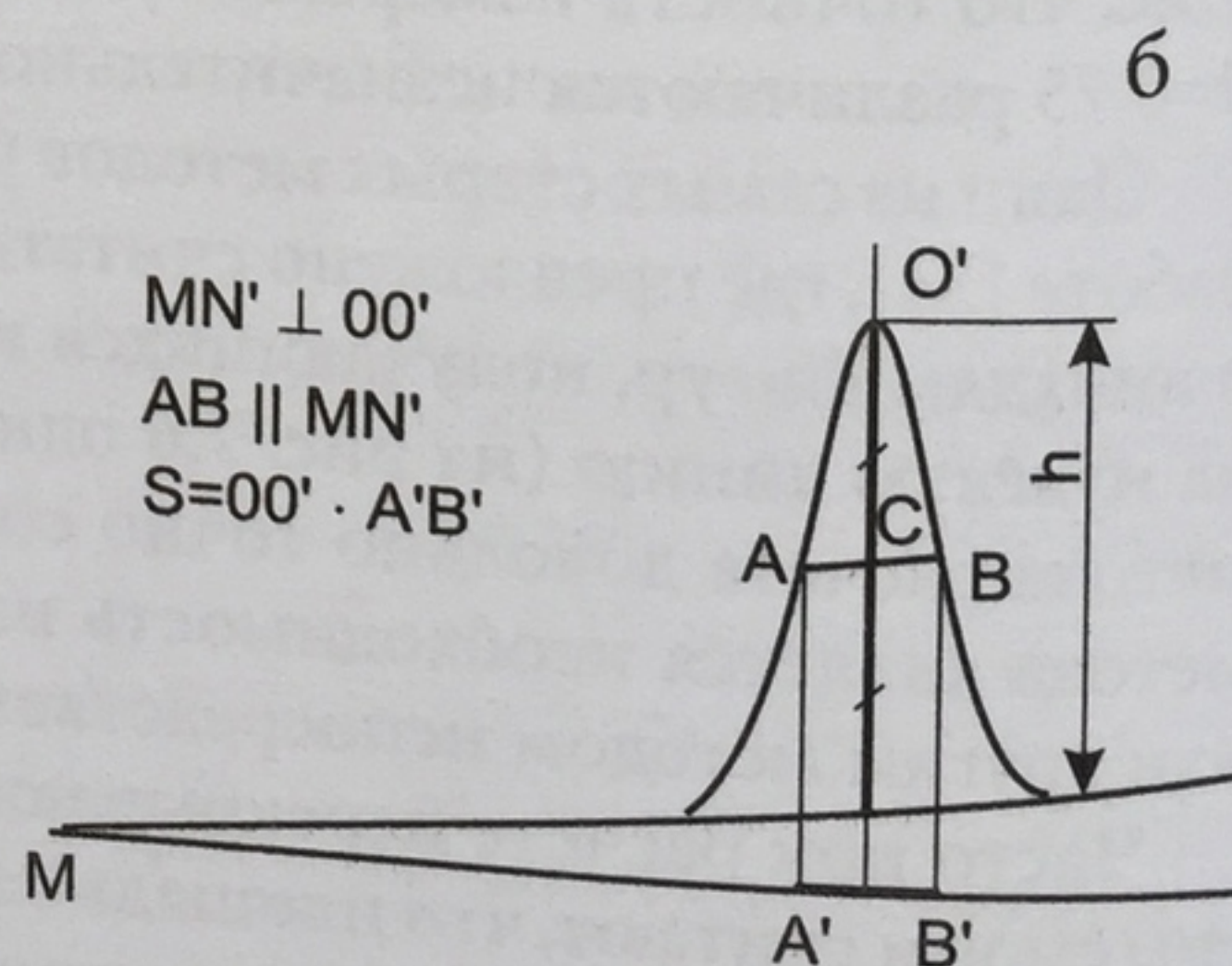
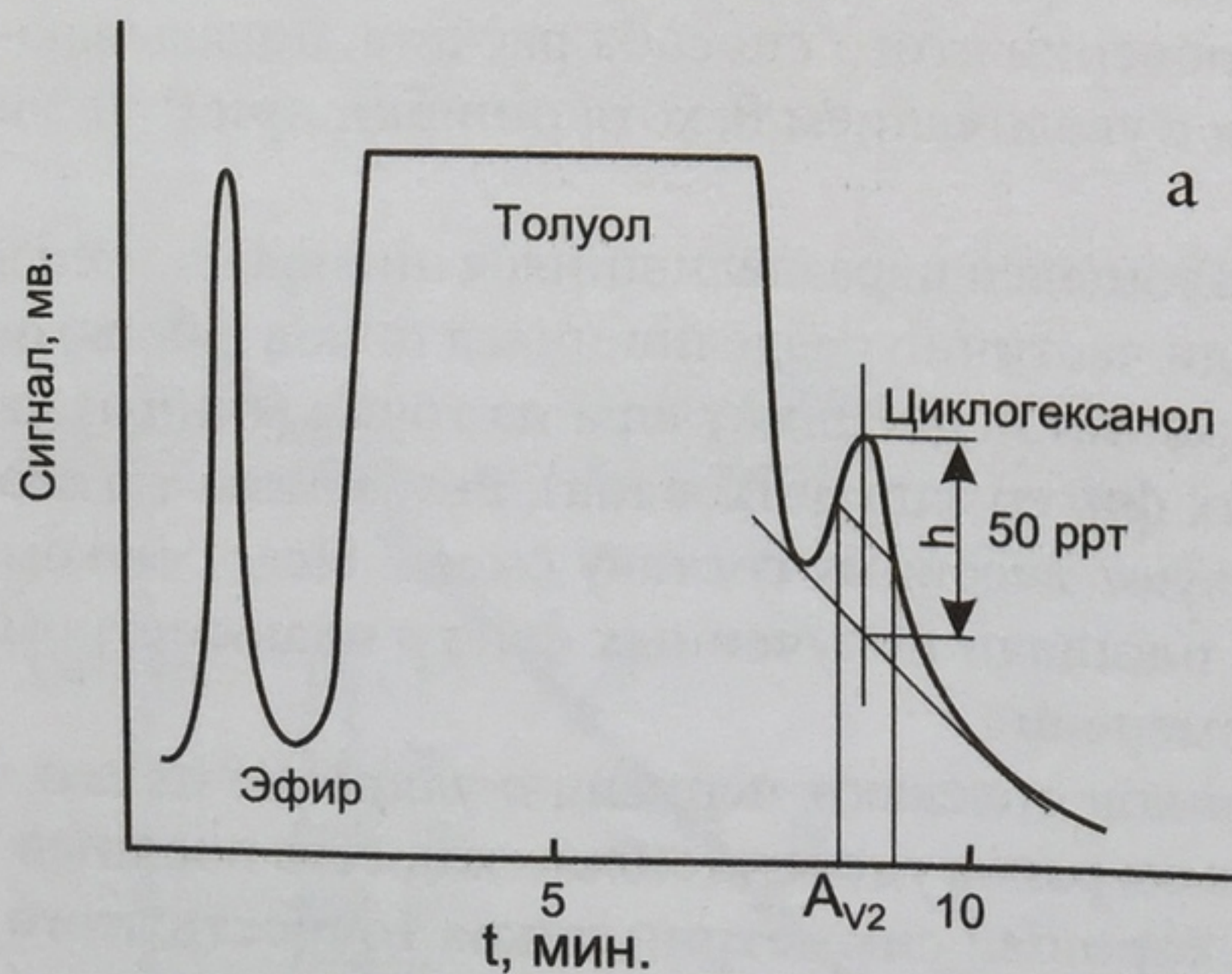


Рис. 7.7. а – Пик примеси на пологом заднем фронте («хвосте») пика основного вещества; б – определение площади пика при наличии дрейфа нулевого сигнала хроматографа

7.6. Расчет состава смесей по хроматограммам

7.6.1. Метод внутренней нормализации

При наличии идеального детектора, отклик которого совершенно не зависит от свойств анализируемого вещества, а только от его концентрации в газе-носителе, величина площади хроматографического пика давала бы исчерпывающую информацию о количестве вещества, введенного в хроматограф с пробой определенного объема. Предполагая, что исследуемая смесь не содержит нерегистрируемых на хроматограмме примесей, мы могли бы считать общую площадь всей хроматограммы пропорциональной количеству введенной в хроматограф анализируемой смеси. В этом случае процентное содержание каждого компонента определялось бы отношением площади этого компонента к сумме площадей всех пиков хроматограммы [56, 57].

Величину процентного содержания, определенную таким образом, будем в дальнейшем называть хроматографическим процентом. Сам метод расчета, при котором суммарную площадь всех пиков хроматограммы ставят в соответствие полному количеству анализируемой смеси, т. е. принимают за 100%, называют *методом внутренней нормализации*. Естественно, что вместо точных значений площадей пиков могут быть использованы любые величины, им пропорциональные: произведение высоты пика на его ширину в середине высоты или на любой другой, постоянной для всех пиков хроматограммы, доле высоты. С равным успехом могут быть применены величины произведения высоты на время удерживания компонентов.

Метод внутренней нормализации является наиболее широко распространенным методом количественной обработки хроматограмм, однако для получения достаточно точных и объективных данных необходимо учитывать некоторые осложняющие обстоятельства. Как правило, сигнал любого детектора в значительной степени зависит от индивидуальных свойств компонентов анализируемой смеси. Это может служить причиной весьма значительных расхождений между величинами истинных (весовых или мольных) и найденных хроматографически концентраций. Для получения достоверных результатов площадь пика, соответствующего определенному компоненту, приходится умножать на экспериментально или теоретически найденные множители, называемые градуировочными коэффициентами. Величина их зависит от свойств вещества, способа детектирования, а также от конструкции детектора. Часто величину градуировочных коэффициентов можно связать со значением какого-либо физического или химического свойства вещества (теплота сгорания, молекулярная масса, показатель преломления, коэффициент поглощения в УФ-свете и др.). В других случаях такой простой связи проследить не удастся. Произведение площадей пиков и градуировочных коэффициентов дает величины приведенных площадей, которые и могут использоваться для внутренней нормализации.

В большинстве случаев в пределах линейного диапазона детектора градуировочные коэффициенты остаются для данного вещества постоянными. В отдельных, к сожалению, довольно редких случаях градуировочные коэффициенты различных веществ близки к единице (например, в газовой хроматографии при анализе углеводородов с детектором по теплопроводности в токе гелия или водорода, обладающих значительно большей, чем другие газы, теплопроводностью, см. ниже).

Экспериментальное определение градуировочных коэффициентов может проводиться двумя основными способами. Первый из них заключается в том, что в хроматограф

вводят точно известные количества определяемых веществ и находят зависимость площади получающегося пика от абсолютного количества введенного в колонку вещества. Такой способ называется методом абсолютной градуировки. Чаще применяется другой способ определения относительных градуировочных коэффициентов. Градуировочный коэффициент может быть определен как величина, показывающая, во сколько раз нужно изменить записанную площадь пика, чтобы ее доля в площади всей хроматограммы точно соответствовала истинному содержанию компонента в пробе. Для бинарной смеси определяемого вещества со стандартным, т. е. таким, для которого относительный градуировочный коэффициент принят за единицу, можно написать:

$$C_i = \frac{K_i S_i 100}{K_i S_i + S_{st}} \quad (7.5)$$

где C_i – истинное содержание определяемого компонента в бинарной смеси; K_i – относительный градуировочный коэффициент; S_i и S_{st} – площади пиков анализируемого и стандартного веществ. Решая уравнение (7.5) относительно K_i , получим:

$$K_i = \frac{C_i S_{st}}{(100 - C_i) S_i} \quad (7.6)$$

Для бинарной смеси величина $(100 - C_i)$ равна истинному содержанию стандартного соединения. Отношение концентраций определяемого и стандартного соединений не изменится, если вместо C_i и $C_{st} = (100 - C_i)$ мы подставим концентрации этих компонентов в многокомпонентной смеси. Если учесть, что отношение площадей S_{st}/S_i равно отношению долей площади соответствующих пиков на хроматограмме, т. е. отношению хроматографических процентов, то для K_i можно получить выражение, удобное в практической работе:

$$K = \frac{P_{st} C_i}{C_{st} P_i} \quad (7.7)$$

где C и P – соответственно, истинные и хроматографические проценты определяемого и стандартного веществ. Отсюда следует, что для определения относительных градуировочных коэффициентов веществ достаточно составить смесь их со стандартным веществом, причем состав смеси должен быть известен с высокой точностью. Самые незначительные ошибки при составлении смесей резко изменяют градуировочный коэффициент, так как ошибка изменяет одновременно и числитель, и знаменатель выражения (7.7). Так, при составлении смесей жидкостей с температурой кипения до 200°C авторам удалось достичь воспроизводимых результатов только тогда, когда компоненты вводили чистым медицинским шприцем во взвешенный сосуд, закрытый резиновой пробкой, закрепленной проволокой. Все взвешивания выполнялись на аналитических весах. При этом удалось добиться точности определения градуировочных коэффициентов порядка 2 отн. % [58]. В тех случаях, когда это возможно, желательно контролировать состав смеси химическими или спектральными методами. Все параметры хроматографического процесса при определении градуировочных коэффициентов должны контролироваться с большой тщательностью, а скорость записи хроматограммы и методика измерения или обчета площадей должны обеспечивать максимально возможную точность их определения.

В зависимости от того, переводит ли градуировочный коэффициент хроматографические проценты в мольную или массовую концентрацию, он называется соответственно мольным (K_m) или массовым (K_g). Эти коэффициенты связаны между собой простым соотношением:

$$K_m = K_g \frac{M_{st}}{M_i} \quad (7.8)$$

где M_i и M_{st} – молекулярные массы определяемого и стандартного веществ.

7.6.2. Метод абсолютной градуировки

Метод внутренней нормализации, давая достаточно полную информацию об относительном содержании компонентов смеси, не позволяет оценить абсолютную величину пробы или введенное с ней абсолютное количество отдельных ее компонентов. Между тем решение этого вопроса является особенно важным при определении веществ, содержащихся в анализируемой смеси в виде малых примесей. При концентрации веществ менее 1–2% для их четкого выявления приходится вводить объемы проб, в 5–10 раз и более превышающие количества, применяемые в других случаях. Естественно, что при этих условиях пик основного компонента чаще всего не может быть записан на диаграмме полностью. Кроме того, искажение формы пика, связанное с перегрузкой колонки, затрудняет определение его площади расчетными методами и не позволяет воспользоваться методом нормализации. В таких случаях прибегают к *абсолютной градуировке прибора*, т. е. путем последовательного ввода в хроматограф различных, точно измеренных количеств изучаемого компонента определяют прямую связь между площадью (или высотой) получающегося пика и количеством вводимого вещества. Для получения высококачественных результатов необходима максимальная аккуратность в работе. К проведению хроматографического процесса также предъявляются очень высокие требования. Полученные данные позволяют построить график количество вещества – площадь пика (или его высота), который и используется в дальнейших расчетах [56–60]. Часто градуировочные графики оказываются близки к прямым, что позволяет легко определить градуировочные коэффициенты. В отличие от безразмерных относительных градуировочных коэффициентов, величины, полученные при абсолютной калибровке, имеют размерность мг/см² или мкг/см². После этого процентное содержание примеси может быть определено по формуле:

$$C_i = K \frac{S_i}{g} 100\% \quad (7.9)$$

где g – количество смеси, взятое для анализа. При градуировке по высотам пика градуировочные коэффициенты меняются в зависимости от количества вещества и условий получения хроматограммы. Это требует соблюдения возможно более полной идентичности условий хроматографического процесса при градуировке прибора и при анализе изучаемой смеси. Так, изменение температуры на 1°С вызывает ошибку приблизительно в 2% отн. [55]. Детальное изучение влияния различных факторов на точность результатов, полученных методом абсолютной градуировки, предпринято в работе [61].

Метод абсолютной градуировки является наиболее трудоемким из всех способов количественной интерпретации хроматограмм, однако только он позволяет получать абсолютную, а следовательно, наиболее объективную информацию. По этой причине

методом абсолютной градуировки пользуются для проверки других способов количественной обработки хроматограмм.

При решении практических вопросов большую часть сведений, даваемых методом абсолютной градуировки, можно получить с помощью метода внутреннего стандарта, значительно менее трудоемкого. В медико-биологических и токсикологических исследованиях метод абсолютной градуировки оказывается незаменимым лишь в редких случаях. К ним может относиться, например, определение малых концентраций веществ в сочетании с нерегистрируемыми детектором компонентами. Может потребовать абсолютной градуировки прибора и большая быстрота изучаемого процесса, не оставляющая времени для составления искусственных смесей.

7.6.3. Метод внутреннего стандарта

Метод внутреннего стандарта до настоящего времени является одним из наиболее удобных методов получения количественной информации как в хроматографии, так и во многих других аналитических методах. В хроматографии этот метод стали применять с 1954 г. [62]. Этот метод заключается в том, что в исследуемую смесь добавляют точно известное количество вещества – стандарта. Площадь пика этого вещества сравнивают с площадями других пиков и считают, что эти площади пропорциональны содержанию в смеси отдельных компонентов. Метод с успехом применяется при обычном хроматографическом анализе, а также при анализе микропримесей [63, 64]. Добавляемое к исходной смеси вещество (внутренний стандарт) должно отсутствовать в анализируемой пробе, быть вполне устойчивым в применяемых условиях хроматографии, обладать достаточной чистотой и хорошо разделяться в условиях хроматографического опыта со всеми компонентами изучаемой смеси. Однако нежелательно, чтобы пик внутреннего стандарта имел время удерживания значительно меньшее или много большее, чем изучаемые компоненты смеси. Расчет содержания в смеси того или другого компонента проводится следующим образом:

$$C_i = \frac{K_i S_i}{K_{st} S_{st}} R \times 100\% \quad (7.10)$$

где K_i и K_{st} – поправочные коэффициенты определяемого компонента и стандартного соединения, учитывающие особенности применяемого детектора и характер вещества; S_i и S_{st} – площади соответствующих пиков; R – отношение масс внутреннего стандарта и анализируемой смеси. Для высот пиков может применяться такое же выражение. Градуировочные коэффициенты рассчитываются теми или иными методами или определяются анализом смесей известного состава, как описано выше. Приведенная формула пригодна для определения как очень малых, так и значительных концентраций. Если вместо скорректированной площади одного компонента подставить сумму скорректированных площадей всех пиков, записанных на хроматограмме, и полученную величину вычесть из 100%, то можно определить суммарное содержание в исходной смеси веществ, не регистрирующихся на хроматограмме вследствие очень больших удерживаемых объемов, разложения или отсутствия сигнала детектора:

$$C_i = \left(1 - \frac{SK_i S_i}{K_{st} S_{st}} R\right) 100\% \quad (7.11)$$

Таким образом, с применением внутреннего стандарта можно определять, например, содержание в анализируемой смеси смол, солей и других компонентов, не регистрируемых применяемым детектором.

В качестве внутреннего стандарта можно применить также одно из веществ, присутствующих в анализируемой смеси. В этом случае записывают две хроматограммы смеси – до и после добавления стандарта и вычисляют содержание определяемых компонентов по формуле:

$$C_i = \frac{K_i S_i''}{K_2 (S_2' - S_2'' S_i'/S_i')} R \times 100\% \quad (7.12)$$

если определяется содержание любого компонента, кроме того, который был добавлен. Здесь K_i и S_i – градуировочный коэффициент и площадь пика определяемого компонента, а K_2 и S_2 – градуировочный коэффициент и площадь пика того компонента, который был добавлен к смеси в качестве стандарта. Если при использовании метода внутреннего стандарта нужно определить содержание того же компонента, который добавляют в смесь, то можно использовать следующую формулу:

$$C_i = \frac{S_i' S_1''}{S_1' (S_i'' - S_i' S_1''/S_1')} R \times 100\% \quad (7.13)$$

Здесь S_i – площадь пика того компонента, содержание которого нужно определить и который добавлялся к смеси в качестве стандарта; S_1 – площадь пика любого другого компонента анализируемой смеси. Одним и двумя штрихами обозначены площади, полученные до и после добавки стандарта; R – отношение масс добавки и анализируемой смеси.

В том случае, когда анализируется многокомпонентная смесь с широким интервалом температур кипения, целесообразно применить два или три внутренних стандарта. Применяя такой метод, определяли десятые доли процента бензола, толуола и стирола в этилбензоле с точностью до 1–2 отн.%. Аналогичные результаты были получены при анализе смесей акролеина и продуктов его димеризации [65, 66]. В отличие от метода абсолютной градуировки метод внутреннего стандарта при расчете по площади пика относительно мало чувствителен к изменению параметров хроматографического эксперимента. В тех случаях, когда анализ смеси, основные компоненты которой известны, носит эпизодический характер и проведение работы по определению градуировочных коэффициентов нецелесообразно, можно для количественного анализа применить следующий метод. Определив из хроматограммы содержание главных компонентов анализируемой смеси, по полученным данным из аналитически чистых препаратов составляют искусственную смесь того же состава. Если при ее анализе содержание отдельных компонентов не будет соответствовать содержанию их в исходной смеси, составляют новую смесь с увеличенным или уменьшенным содержанием этих веществ. Обычно 2–3 проб достаточно, чтобы получить полное соответствие состава исходной и искусственной смесей. Состав искусственной смеси считают одинаковым с составом исходной смеси. Три изложенных метода решения вопросов количественного определения компонентов анализируемых смесей охватывают почти все случаи, которые встречаются в практике хроматографического анализа.

Литература

1. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В., Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография, М.: Химия, 1986.
2. Андерсон А.А., Жидкостная хроматография аминсоединений, Рига: Зинатне, 1984.
3. Шатц В.Д., Сахартова О.В., Высокоэффективная жидкостная хроматография, Рига: Зинатне, 1988.
4. Шпигун О.А., Золотов Ю.А., Ионная хроматография и ее применение в анализе вод, М.: Изд. Моск. Универс., 1990.
5. Engelhardt H., Miller H., Dreuer B., Chromatographia, 1984, vol. 19, no. 5, pp. 240-245.
6. High Performance Liquid Chromatography in Biochemistry, Henschen A., Hupe K.-P., Lottspeich F., Voelter W., Eds., Weinheim: VCH, 1985.
7. Yost R.W., Ettre L.S., Conlon R.D., Practical Liquid Chromatography, Norwalk: Perkin-Elmer Corp., 1980.
8. Беленький Б.Г., Ганкина Э.С., Мальцев В.Г., Капиллярная жидкостная хроматография, Ленинград, Наука, 1987.
9. Introduction to Microscale High-Performance Liquid Chromatography, Ishii D., Ed., New York: VCH, 1988; русский перевод: Введение в микромасштабную высокоэффективную жидкостную хроматографию, М.: Мир, 1991.
10. Руденко Б.А., Капиллярная хроматография, М.: Наука, 1978, 215 с.
11. Jennings W., Gas Chromatography with Glass Capillary Columns, New York: Academic Press, 1978; русский перевод: Газовая хроматография на стеклянных капиллярных колонках, М.: Мир, 1980.
12. Tesarik K., Komarek K., Kapilarni kolony v plynove chromatografii, Praha: SNTI, 1984; русский перевод: Капиллярные колонки в газовой хроматографии, М.: Мир, 1987.
13. Schomburg G., Husmann H., Chromatographia, 1975, vol. 8, p. 517.
14. German A.L., Pfaffenberger C.D., Thenot J.P., et al., Anal. Chem., 1973, vol. 45, p. 930.
15. Grob K., Grob G., J. Chromatogr. 1976, vol. 125, no. 3, p. 471.
16. Welsch T., Engevald W., Klaucke C., Chromatographia, 1977, vol. 10, p. 22.
17. Buijten G., Blomberg L., Hoffmann S., Markides K., Wnnman T., J. Chromatogr., 1984, vol. 283, pp. 341-346.
18. Grob K., Grob G., Blum W., Walther W., J. Chromatogr., 1982, vol. 244, pp. 197-208.
19. Grob K., Grob G., J. High Resolut. Chromatogr., Chromatogr. Commun., 1982, vol. 5, no. 3, pp. 119-123.
20. Ettre L.S., Introduction to Open Tubular Columns, Norwalk, Con.: Perkin Elmer Corp., 1978.
21. DiCesare J.L., Dong M.W., Atwood J.G., J. Chromatogr. 1981, vol. 217, p. 369.
22. Takeuchi T., Kitamura H., Spitzer T., Ishii D., J. High Resolut. Chromatogr., Chromatogr. Commun., 1983, vol. 6, p. 666.
23. Clark C.R., Chan J.-L., Anal. Chem., 1978, vol. 50, no.4, pp. 635-637.
24. Hupe K.P., Jonker R.J., Rozing G., J. Chromatogr., 1984, vol. 285, p. 253.
25. Wright N.A., Villalanti D.C., Burke M.F., Anal. Chem., 1982, vol. 54, p. 1735.
26. Бражников В.В., Детекторы для хроматографии, М.: Машиностроение, 1992.
27. Liquid Chromatography Detectors, Vickrey T.M., Ed., New York: M. Dekker, 1983.

28. Lawrence J.F., Frei R.W., Chemical Derivatisation in Liquid Chromatography, Amsterdam: Elsevier, 1976.
29. Lawrence J.F., Organic Trace Analysis by Liquid Chromatography, New York: Academic Press, 1981.
30. Руденко Б.А., Руденко Г.И., Высокоэффективные хроматографические процессы, т.1, 2, М.: Наука, 2003.
31. Сакодынский К.И., Бражников В.В., Волков С.А., Зельвенский В.Ю., Приборы для хроматографии, М.: Машиностроение, 1987, 262 с.
32. Horn O., Schwenk U., Hachenberg H., Brenstoff Chemie, 1958, B.39, S. 336.
33. Dimbat M., Porter P.E., Stross F.H., Anal. Chem. 1956, vol. 28, p. 290.
34. Keulemans A.I.M., Kwantes A., Zaal P., Anal. Chim. Acta, 1955, vol. 13, p. 357.
35. Halasz I., Schneider W., In: 3rd Intern. Symposium on Gas Chromatogr. (1960, Edinburgh), London: Butterworths, 1960 p. 121; русский перевод: Газовая хроматография. Труды III Международн. симпоз. по газовой хроматографии, Эдинбург, 1960; М: Мир, 1964, с. 142.
36. Schwenk U., Hachenberg H., Schneck E., Brenstoff-Chem., 1960, B. 41, № 2, S. 33-38.
37. Lapidus L., Amundsen N.R., J. Phys. Chem., 1952, vol.56, p. 984. ,
38. Glueckauf E., Trans. Farad. Soc., 1955, vol. 51, p. 34.
39. Giddings J.K., Dynamics of Chromatography, New York: M. Dekker, 1965.
40. Keulemans A.I.M., Gas Chromatography, New York: Reinhold, 1957; русский перевод: Хроматография газов, М.: Изд. иностр. лит., 1958.
41. Harris W.E., Habgood H.W., Programmed Temperature Gas Chromatography, New York, London: Wiley, 1966; русский перевод: Газовая хроматография с программированием температуры, М.: Мир, 1968.
42. Martin R.L., Anal. Chem., 1960, vol. 32, p. 336.
43. Scott R.P.W., Grant D.W., Analyst, 1964, vol. 89, p. 1753.
44. Kaiser R., Chromatographie in der Gasphase, Teil 4, Quantitative Calculationen, Mannheim: Bibliogr. Inst., 1962, 262 S.
45. Руденко Б.А., Белов В.Ф., Шоромов Н.П., Журн. Аналит. Хим., 1981, т. 36, № 9, с. 1976.
46. Bartlet J.C., Smith D.M., Canad. J. Chem., 1960, vol. 38, p. 2057.
47. Туркельтауб Н.М., Шемятенкова В.Т., Паламарчук И.А., Нечаева А.А., Заводск. Лаборат. 1960, т. 26, с. 1075.
48. Руденко Б.А., Норовян А.С., Кучеров В.Ф., Журн. Аналит. Хим., 1968, т. 23, № 1, с. 114.
49. Руденко Б.А., Журн. Аналит. Хим., 1970, т. 25, № 3, с. 341.
50. Руденко Б.А., Метляева С.А., Илькова Э.Л., Журн. Аналит. Хим., 1970, т. 25, № 4, с. 670.
51. Polezzo S., Taramasso M., La Chimica l'industria, 1962, vol. 44, p. 33.
52. Богомолов В.И., Миначев Х.М., Романова Н.Б., В кн.: Молекулярная хроматография, Чмутов К.В., ред., М.: Госхимиздат, 1964, с. 18.
53. Жуховицкий А.А., Казанский Б.А., Стерлигов О.Д., Туркельтауб Н.М., Докл. АН СССР, 1958, т. 123, с 1037.
54. Frederiks E.M., Brooks F.D., Anal. Chem. 1956, vol. 28, no. 1, p. 297.
55. Иоффе Б.В., Столяров Б.В., Нефтехимия, 1962, т. 2, с. 911.
56. Коган Л.А., Количественная газовая хроматография, М.: Химия, 1975, 182 с.

57. Novak J., Quantitative Analysis by Gas Chromatography, New York: M. Dekker, 1975, 176 p.4;
русский перевод: Количественный анализ методом газовой хроматографии, М.: Мир,
1978.
58. Руденко Б.А., Потапова Л.Г., Кучеров В.Ф., Нефтехимия, 1969, т.9, № 1, с. 137.
59. Pitsch H., Erdol und Kohle, 1958, B. 11, S. 157.
60. Altschuller A.P., Clemens C.A., Anal. Chem., 1962, vol. 34, no. 2, p. 466.
61. Horn O., Schwenk U., Hachenberg H., Brennstoff Chemie, 1958, B. 39, S. 336.
62. Ray N.H., J. Appl. Chem. 1954, vol. 4, no. 2, p. 82.
63. Martin R.L., Winters J.C., Anal. Chem. 1959, vol. 31, p. 1954.
64. Dal Nogare S.D., Juvet R.S., Anal. Chem., 1962, vol 34, no. 5, p. 35R.
65. Lee H.E., Oliver G.B., Anal. Chem. 1959, vol. 31, p. 1925.
66. Влодавец М.Г., Гольдберг К.А., Одиных В.И., Синович И.А., Заводск. Лаборат., 1962, т.
28, № 2, с. 145.

ТО
НА

Жидкости
локнистых ср
пиллярного в
(насосов, нагн
сред сделали в
тографии, осу
тография) либ
тография).
Преимущ
одновременно
случаев приме
хроматографи
обработки бум
или газообразн
сурьмы, пары
Техника об
пластинах, вкл
ние хромат
описан
11-2
В
исполь
ной кляк
водным ко
рафического р
вижной фазы.
В целях анал
достаточной дл
робу в виде пя
ной полос
исход

ГЛАВА 8

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В АНАЛИЗЕ НАРКОТИЧЕСКИХ И ДОПИНГОВЫХ СРЕДСТВ

Жидкости могут течь в открытых каналах (лотки, желоба и т.п.). В пористых или волокнистых средах жидкости могут достаточно энергично распространяться за счет капиллярного всасывания (впитывания) без применения каких-либо побудителей потока (насосов, нагнетательных сосудов и т.п.). Эти две отличительные особенности жидких сред сделали возможным возникновение и развитие планарной (плоскостной) хроматографии, осуществляемой в открытых плоских слоях целлюлозы (бумажная хроматография) либо порошкообразных или органических сорбентов (тонкослойная хроматография).

Преимуществами этих методов являются высокая производительность по числу одновременно анализируемых проб, простота исполнения, достаточная для многих случаев применения разделяющая способность и, наконец, возможность визуализации хроматографических зон (полос или пятен) бесцветных разделенных веществ путем обработки бумажного листа или тонкослойной пластинки разнообразными жидкими или газообразными реагентами (серная кислота, азотная кислота, растворы хлоридов сурьмы, пары брома и иода, аммиак, хлор и др.).

Техника обычной планарной хроматографии как на бумаге, так и на тонкослойных пластинах, включая выполнение самих разделений анализируемых веществ, проявление хроматограмм и их последующую обработку (визуализацию), достаточно подробно описаны в большом числе монографий [1–10] и оригинальных статей [см., например, 11–22].

В своей простейшей форме планарная хроматография легко осуществляется при использовании промокательной (фильтровальной) бумаги для удаления чернильной кляксы. На бумаге при этом возникает чернильное пятно, окруженное светлым водным кольцом. Это явление представляет собой простейший случай хроматографического разделения с использованием бумаги (целлюлозы) в качестве неподвижной фазы.

В целях анализа или разделения смеси веществ обычно используют бумажную полосу достаточной длины. Вблизи одного из концов этой полосы помещают анализируемую пробу в виде пятна или полосы по возможности небольших размеров, и этот конец бумажной полосы опускают в жидкую подвижную фазу, так чтобы уровень жидкости был ниже исходного пятна нанесенной пробы. Под действием капиллярных сил жидкая подвижная фаза начинает подниматься по бумажной полоске, захватывая при этом компоненты разделяемой пробы, которые продвигаются каждый со своей скоростью в соответствии с их адсорбционной способностью.

Процесс прекращают, когда верхняя граница смоченной подвижной фазой части бумажной полоски немного не достигает ее верхнего края. Далее бумажную полосу высушивают и изучают расположение на ней пятен разделенных компонентов. Такой процесс называется бумажной хроматографией в «восходящем варианте». В тех случаях, когда в качестве подвижной фазы применяют легколетучие органические растворители или их водные растворы, для того чтобы предотвратить изменение ее состава вследствие испарения этих компонентов, процесс хроматографии проводят в замкнутом сосуде, называемом хроматографической камерой (рис. 8.1).

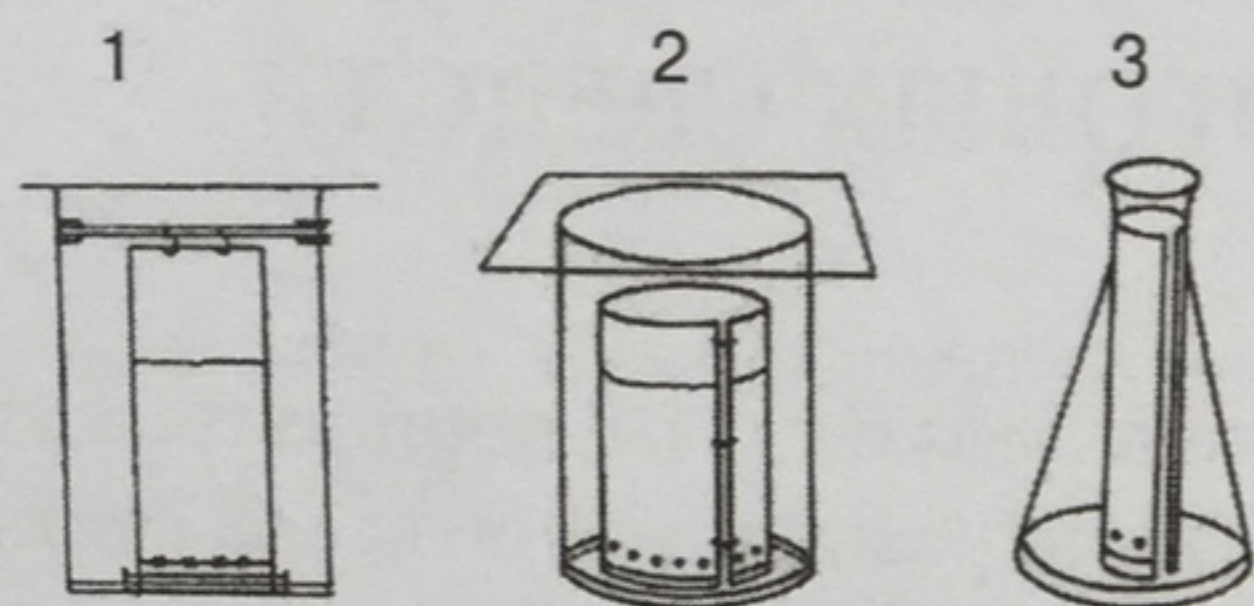


Рис. 8.1. Восходящая бумажная хроматография: 1 и 2 – в цилиндрических сосудах; 3 – в конической колбе

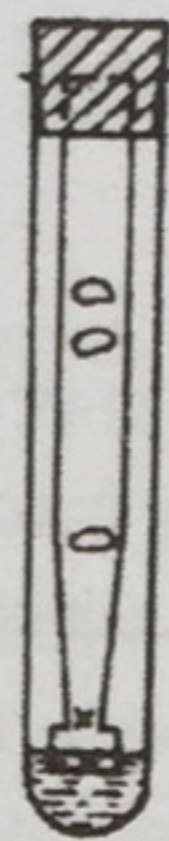


Рис. 8.2. Восходящая бумажная хроматография в пробирке

При эпизодических анализах или, наоборот, при необходимости выполнять очень большое число анализов оказывается весьма удобным очень экономичный вариант восходящей хроматографии на узких полосках бумаги в пробирке в качестве миниатюрной хроматографической камеры (рис. 8.2).

В направлении сверху-вниз под действием силы тяжести жидкости просачиваются значительно быстрее, чем поднимаются вверх под действием только капиллярных сил. Поэтому нисходящий вариант (рис. 8.3) бумажной хроматографии оказывается существенно

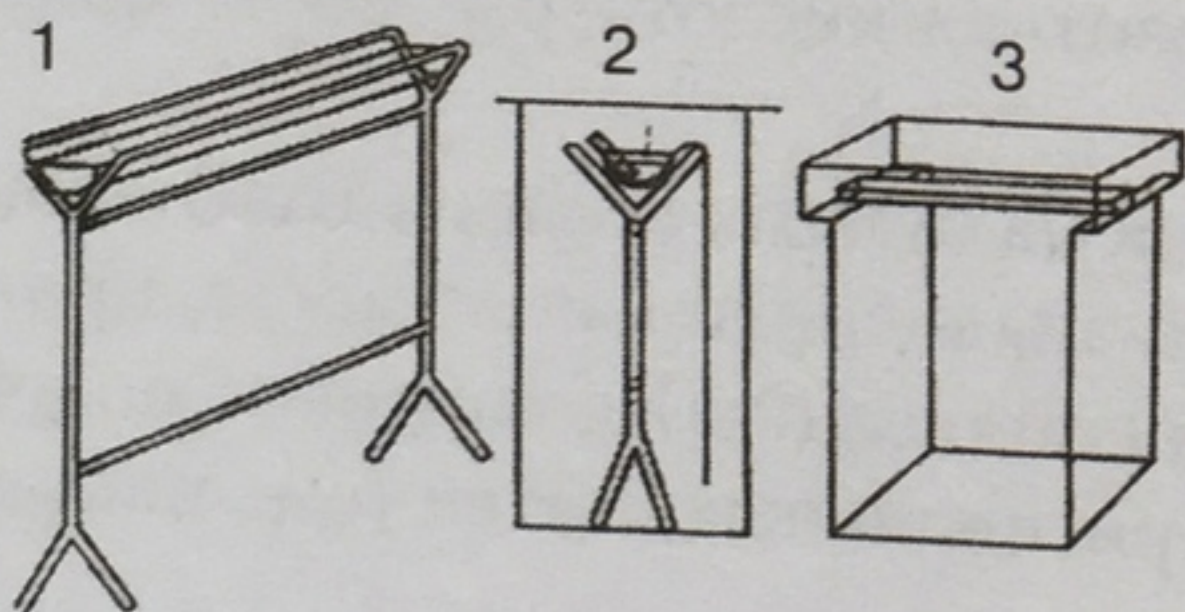


Рис. 8.3. Нисходящая бумажная хроматография: 1 – лоток для растворителя (подвижной фазы); 2 – нисходящая бумажная хроматография в сосуде (камере) подходящего объема; 3 – сосуд для нисходящей бумажной хроматографии с плечиками для установки лотка с подвижной фазой

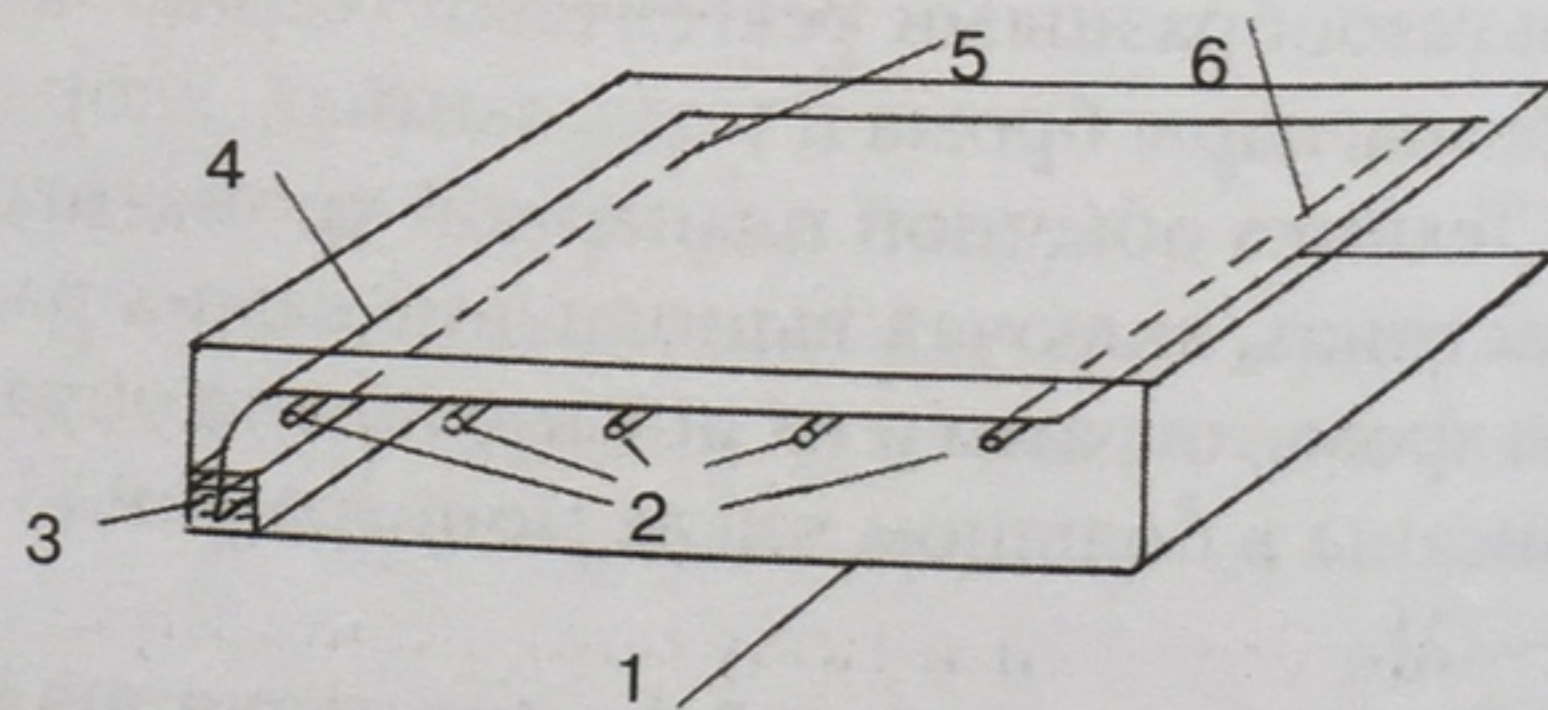


Рис. 8.4. Горизонтальная бумажная хроматография: 1 – камера; 2 – полиэтиленовые или фторопластовые стержни, поддерживающие лист хроматографической бумаги; 3 – растворитель (подвижная фаза); 4 – лист хроматографической бумаги; 5 – линия нанесения проб; 6 – линия фронта растворителя в конце хроматографического опыта

более быстрым, чем восходящий. Известны также горизонтальный (рис. 8.4) и круговой (рис. 8.5) варианты бумажной хроматографии. Очень удобным в повседневной лабораторной практике и экономичным является метод круговой бумажной хроматографии на свернутой в рулон бумажной полосе (рис. 8.6). Чтобы избежать слипания витков этого рулона, бумажную полосу сворачивают вместе с полоской рифленого полиэтилена или фторопласта, не смачивающегося применяемой подвижной фазой. Такой вариант бумажной хроматогра-

фии применяли чехословацкие исследователи Хайс и Мацек при изучении состава алкалоидов растения *Rauvolfia reserpina*.

Каждый из этих способов бумажной хроматографии имеет свою специфическую область применения, свои достоинства и недостатки.

Пятна окрашенных веществ можно наблюдать невооруженным глазом. Пятна многих бесцветных соединений становятся видимыми при опрыскивании или смачивании полученной хроматограммы различными реактивами, при обработке хроматограмм аммиаком, сероводородом, парами иода, брома и других веществ, а также при облучении ультрафиолетовым светом. При этом достигается исключительно высокая чувствительность определения: уверенно регистрируются пятна, содержащие 10^{-12} – 10^{-15} г вещества.

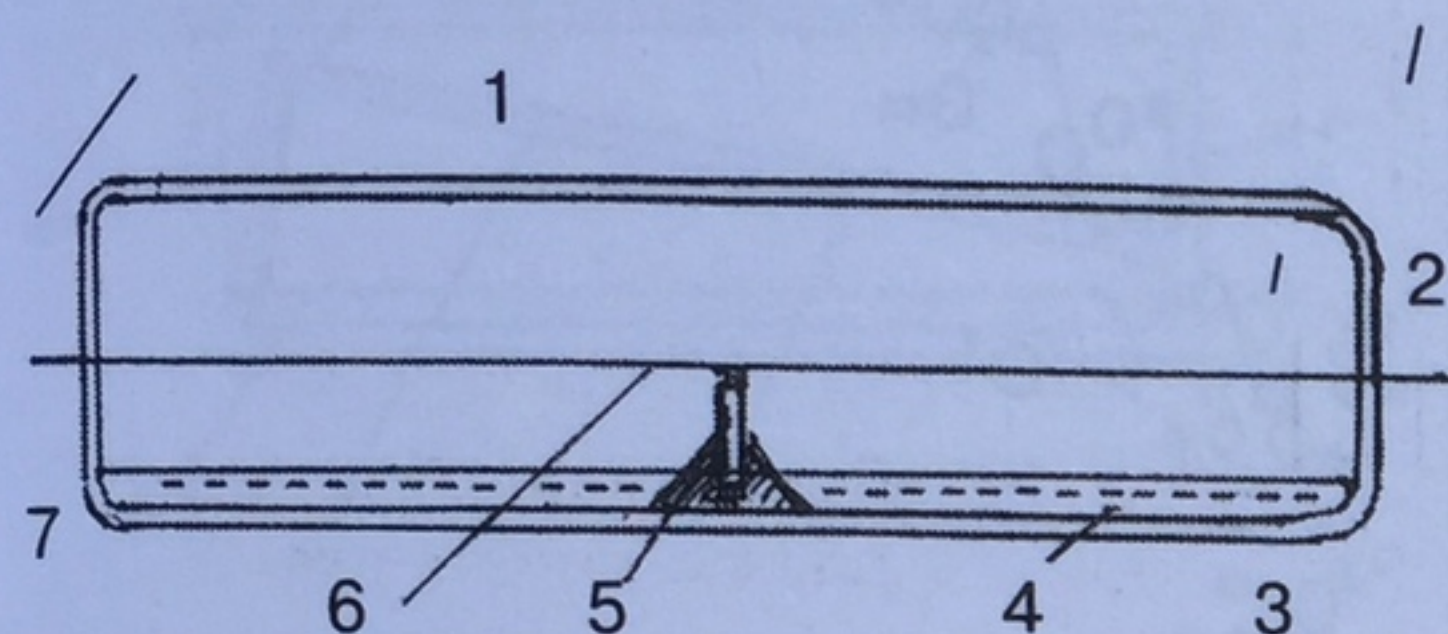


Рис. 8.5. Круговая хроматография на бумаге:
1 – крышка хроматографической камеры; 2 – лист хроматографической бумаги; 3 – хроматографическая камера (чашка Петри подходящего размера); 4 – подвижная фаза (растворитель); 5 – фитиль для подачи подвижной фазы; 6 – окружность, на которую наносятся пробы, подлежащие разделению; 7 – линия фронта растворителя в конце хроматографического опыта

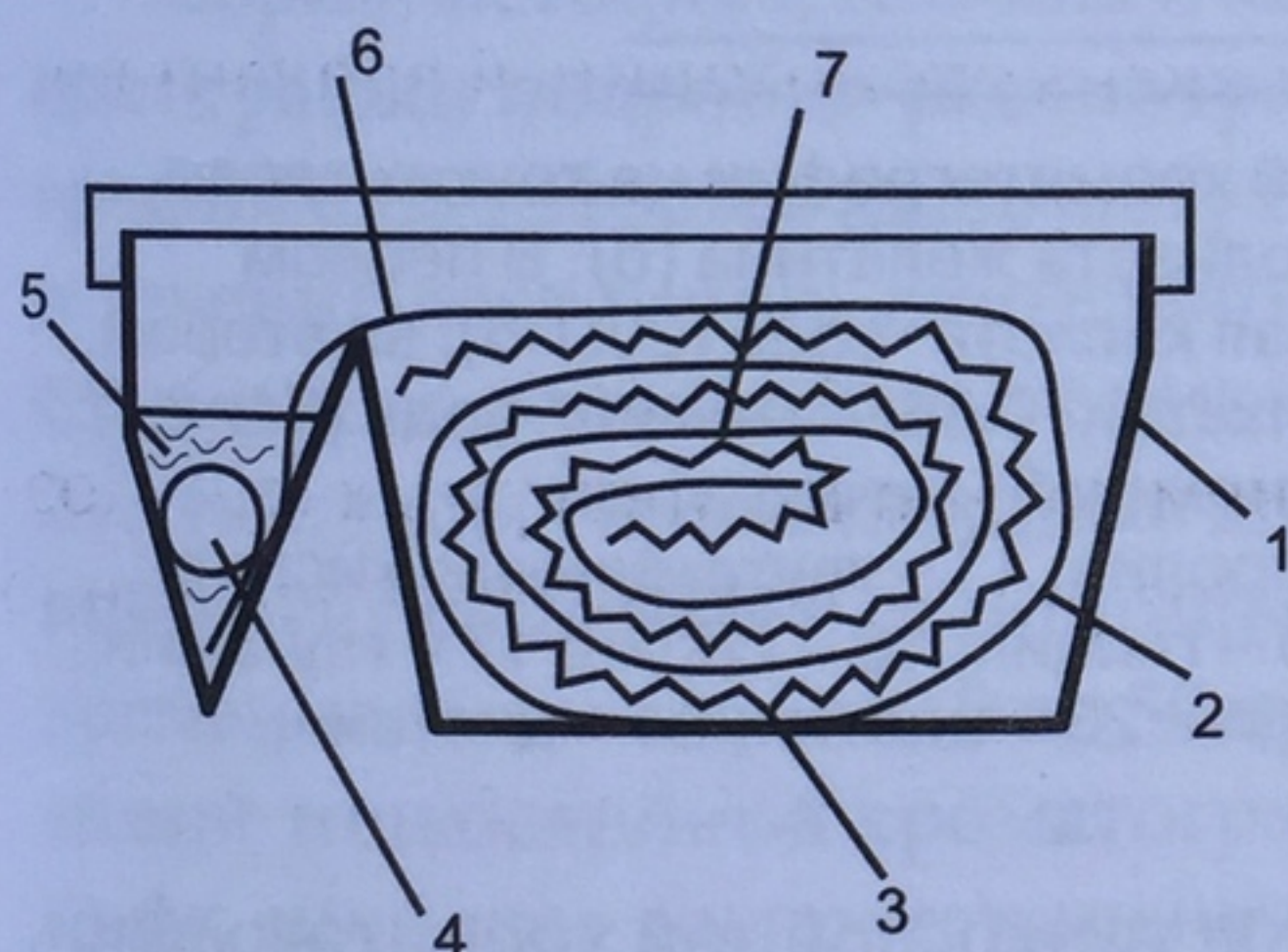


Рис. 8.6. Бумажная хроматография на свернутой в рулон полоске бумаги: 1 – хроматографическая камера; 2 – полоска хроматографической бумаги; 3 – рифленая полоса из полиэтиленового или фторопластового листа; 4 – отрезок стеклянной палочки, удерживающий конец бумажной полоски в резервуаре для растворителя (подвижной фазы); 5 – подвижная фаза (растворитель); 6 – линия нанесения проб (линия старта); 7 – линия фронта подвижной фазы в конце хроматографического опыта

Важным преимуществом планарной хроматографии вообще и бумажной хроматографии в частности является возможность легкого осуществления двумерного процесса. В этом случае пятно исходной смеси наносят вблизи одного из углов квадратного листа бумаги и получают первичную хроматограмму. Затем поворачивают лист на 90° и проводят хроматографический процесс в перпендикулярном направлении (час с другим составом подвижной фазы). При этом каждое пятно первичной хроматограммы разделяется на несколько пятен составляющих его компонентов. Это позволяет детально исследовать состав весьма сложных по составу смесей, например, таких как гидролизаты белков, культуральные жидкости микроорганизмов, экстракты сложного состава и т.п. (рис. 8.7).

История, области применения, техника и методика, достоинства и недостатки метода бумажной хроматографии подробно освещены в целом ряде оригинальных работ, монографий и библиографических сборников [1, 2, 11, 23–25]. К сожалению, ограниченная сорбционная способность бумаги и специфические особенности ее волокнистой структуры, затрудняющие массообмен между сорбирующей поверхностью и потоком подвижной фазы, не позволяют достичь достаточно высокой эффективности хроматографического разделения с применением этого материала. Даже при использовании полос и листов бумаги длиной до 1 м экспериментаторам удавалось добиться реальной эффективности раз-

деления, не превышающей 1–1,5 тыс. теор. тарелок (т.т.). Хотя теория тарелок не в полной мере применима к обычным процессам планарной хроматографии вследствие сложного характера движения подвижной фазы под действием только капиллярных сил, величины чисел теоретических тарелок, рассчитанные по обычным формулам, будут использоваться в этой главе для ориентировочной характеристики возможностей разделения веществ с помощью методов планарной хроматографии.

Несмотря на ограниченную эффективность достигаемого разделения, метод бумажной хроматографии оказался исключительно плодотворным в биохимии, фармации, медицине, в криминалистике и в целом ряде других смежных областей науки и технологии.

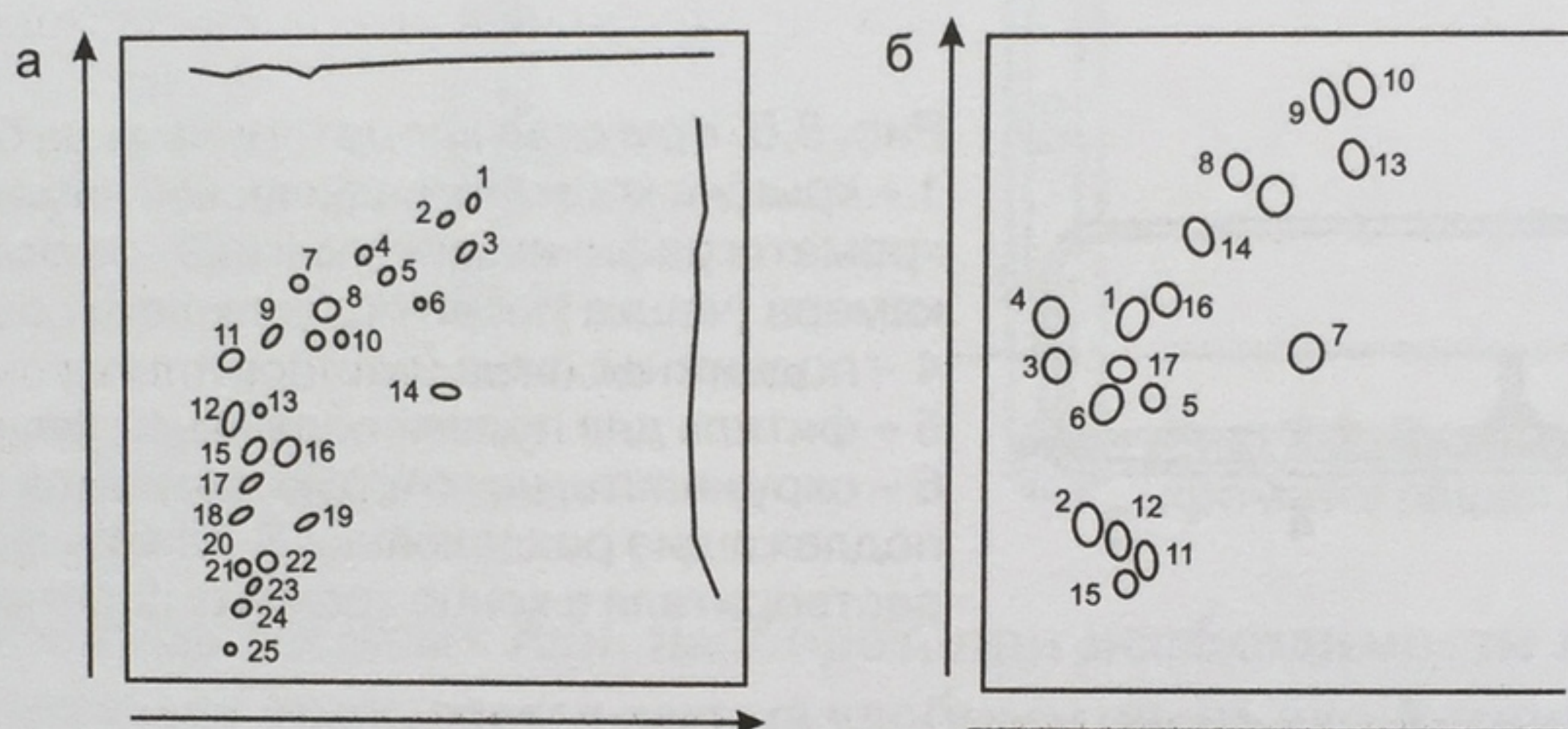


Рис. 8.7. Хроматографическое разделение методом двумерной хроматографии на тонких слоях порошка целлюлозы модельной смеси аминокислот (а) и гидролизата желатина (б). В первом направлении подвижная фаза – смесь изопропанол–муравьиная кислота–вода (20:1:5); во втором направлении подвижная фаза – смесь трет.бутанол–метилэтилкетон–0.88М аммиак–вода (5:3:1:1): 1 – лейцин; 2 – изолейцин; 3 – фенилаланин; 4 – валин; 5 – метионин; 6 – триптофан; 7 – 2-аминомасляная кислота; 8 – тирозин; 9 – α -аланин; 10 – пролин; 11 – глутаминовая кислота; 12 – аспарагиновая кислота; 13 – оксипролин; 14 – треонин; 15 – глицин; 16 – серин; 17 – глутамин; 18 – аргинин; 19 – таурин; 20 – лизин; 21 – орнитин; 22 – гистидин; 23 – цистин; 24 – цистеин; 25 – оксилизин

Более универсальным и эффективным оказался метод тонкослойной хроматографии, осуществляемый в тонких слоях порошкообразных неорганических и органических адсорбентов (диоксида кремния, силикагеля, оксида алюминия, талька, крахмала, полиамидного порошка и др.), нанесенных на стеклянные, металлические или пластиковые пластины-подложки в виде свободного незакрепленного слоя порошка с частицами размером 25–50 мкм или закрепленного монолитного слоя, частицы которого прочно скреплены между собой и с применяемой подложкой с помощью подходящего связующего (гипса, крахмала, жидкого стекла и др.).

Как и бумажная хроматография, процесс тонкослойной хроматографии может осуществляться в восходящем, нисходящем или плоскостном вариантах. Однако при работе с пластинками с незакрепленными слоями и нисходящий и восходящий варианты осуществляются только при небольших углах наклона пластинок к горизонтали (рис. 8.8).

Осознанное применение тонкослойной хроматографии для целей анализа впервые было проведено в 1938 г. российскими исследователями Т. А. Измайловым и М. С. Шрайбер [12] при изучении состава фармацевтических препаратов – экстрактов растений и микстур. Дальнейшее развитие этого метода было задержано в годы Великой Отечественной войны, однако приобрело довольно интенсивный характер после публикаций весьма обстоятельных работ Шталя [3, 14] и Кирхнера [4].

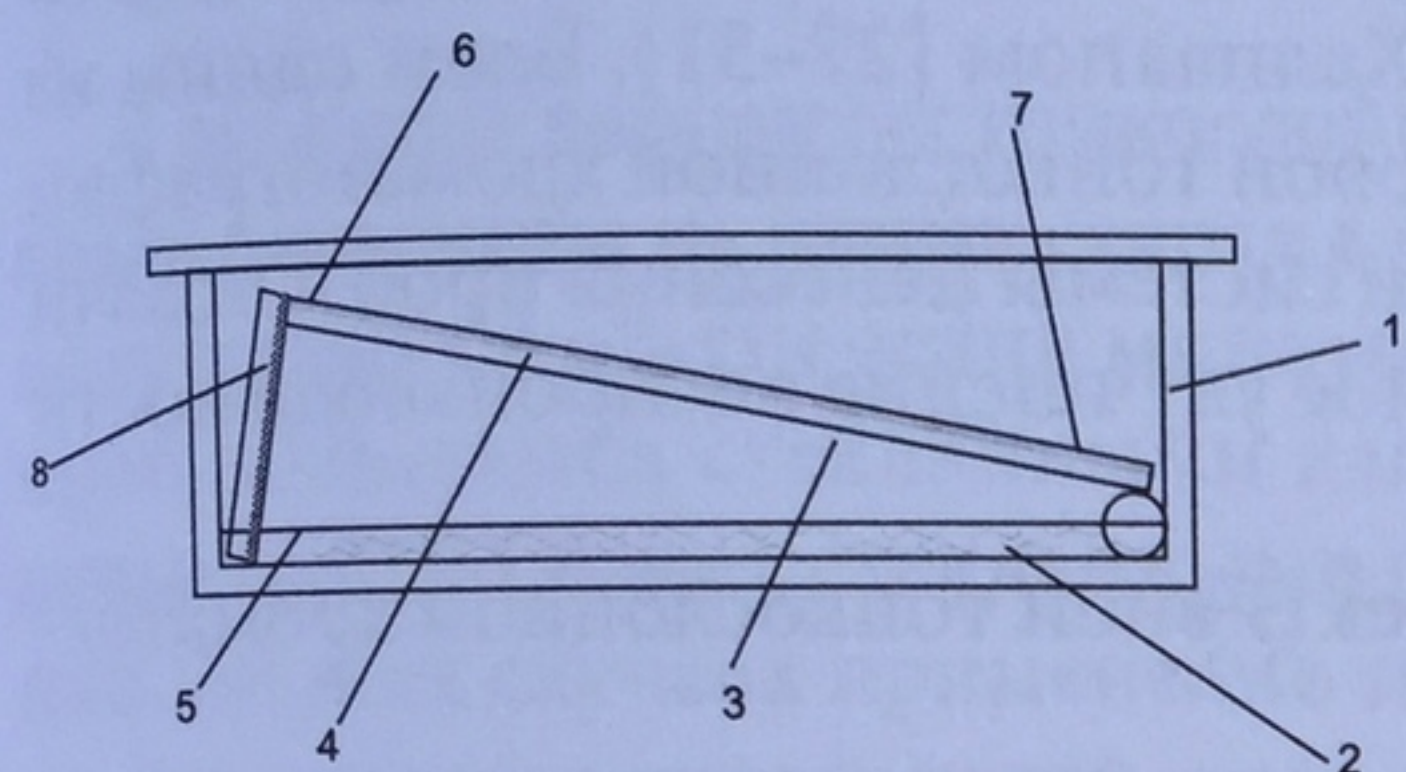
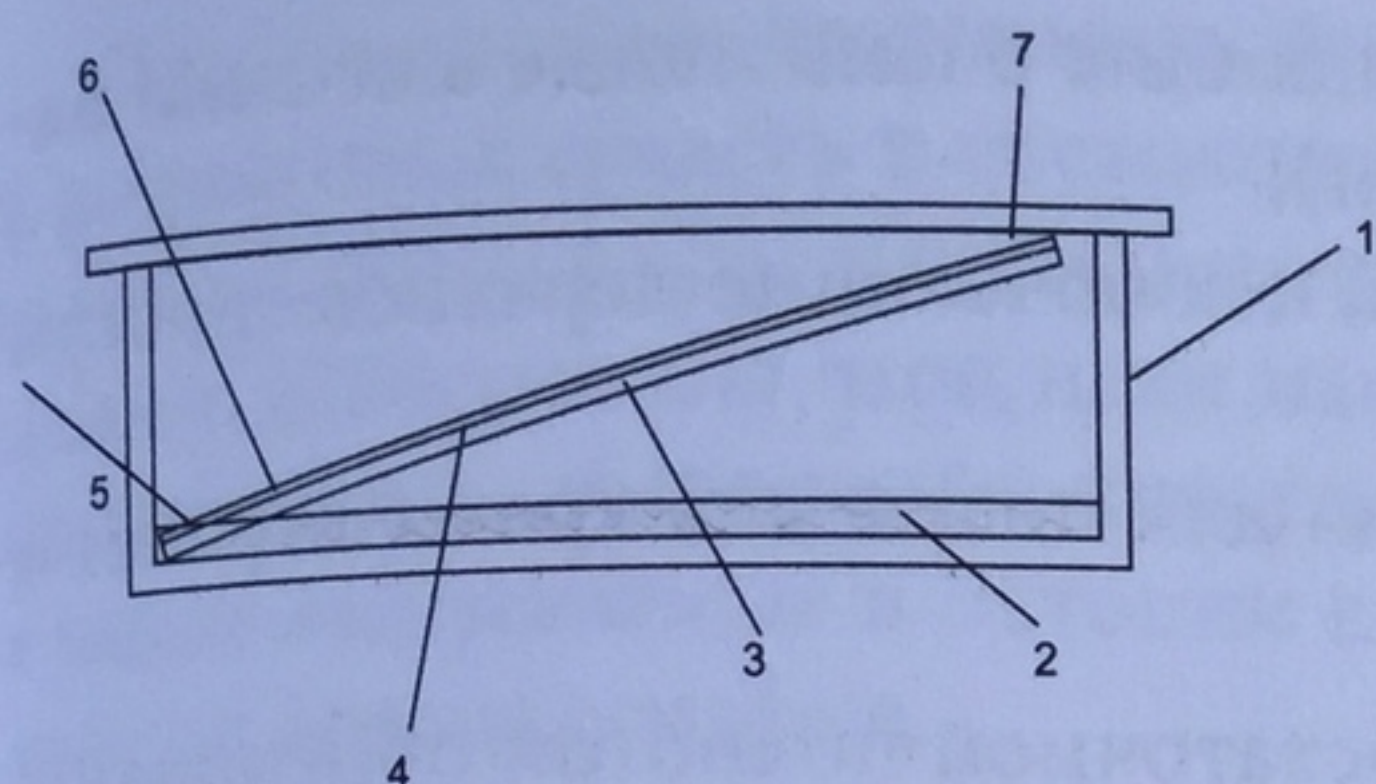


Рис. 8.8. Тонкослойная хроматография на незакрепленных слоях сорбента:

а – восходящий вариант; б – нисходящий вариант;
 1 – хроматографическая камера; 2 – подвижная фаза (растворитель); 3 – хроматографическая пластинка; 4 – незакрепленный слой адсорбента; 5 – уровень погружения пластинки в растворитель; 6 – линия нанесения проб (линия старта); 7 – линия фронта растворителя в конце хроматографического опыта; 8 – пластинка с пористым слоем для подачи подвижной фазы

Теория, методика, техника и многообразные области применения тонкослойной хроматографии подробно рассмотрены в многочисленных оригинальных работах и монографиях, из которых здесь могут быть упомянуты лишь немногие [5–9, 16–21]. Однако в течение достаточно длительного времени эффективность разделения, достигаемого с помощью этого метода, оказывалась относительно небольшой и не превышающей 2–3 тыс. теор. тарелок. Однако доступность методов планарной хроматографии, широкий круг решаемых с ее помощью аналитических задач, и, главное, возможность одновременного анализа от 10 до 50 проб на одном листе хроматографической бумаги или на одной тонкослойной хроматографической пластинке обеспечили этой группе методов очень широкое распространение.

В 70–80-е годы XX столетия были разработаны приемы, позволившие значительно увеличить эффективность тонкослойной хроматографии. При этом оказалось возможным обеспечить разделение за один цикл анализа до 30–40 компонентов анализируемых смесей за время порядка 10 мин. При этом величины анализируемых проб могут составлять нанограммовые количества (1–10 нг), а предельно определяемые количества отдельных компонентов могут составлять фемтограммовые величины (10^{-15} г).

В целом, эффективность усовершенствованных модификаций тонкослойной хроматографии более чем на один порядок величины превысила значения, характерные для ее классических вариантов. Это дало возможность говорить о формировании, по существу, нового аналитического метода – высокоэффективной тонкослойной хроматографии [26]. Создание этого нового метода явилось результатом ряда усовершенствований, логически вытекающих из общих положений теории высокоэффективной хроматографии.

Наиболее важными из этих усовершенствований явились следующие:

- а) применение адсорбентов с оптимальными характеристиками, аналогичными требованиям высокоэффективной колоночной жидкостной хроматографии (малый размер зерна порядка 3–5 мкм; однородность размеров зерен (разброс размеров не более 10% отн.), низкое сопротивление массопередаче, тщательное кондиционирование адсорбентов и др.);

- б) улучшенные способы нанесения проб, обеспечивающие очень малые значения начальной ширины хроматографических зон (пятен);
- в) усовершенствованные способы подвода элюента, исключаящие неравномерности его продвижения в слое сорбента;
- г) применение усовершенствованного оборудования для получения хроматограмм и их количественной обработки.

В целом, все эти усовершенствования были с достаточной полнотой обоснованы теоретическим анализом процессов тонкослойной хроматографии, подробно рассмотренным в книге Гейтса [10]. Новые тонкослойные пластинки для высокоэффективной хроматографии были разработаны Эйзенбейсом и Халпапом [27–31]. Блом одним из первых применил весьма действенный вариант круговой тонкослойной хроматографии [29]. Ионхен и Хезел существенно усовершенствовали системы нанесения проб и подачи подвижной фазы [30, 31], что обеспечило значительное улучшение воспроизводимости обсуждаемого метода.

Ниже основные особенности метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии рассмотрены более подробно.

8.1. Подготовка сорбентов и приготовление тонкослойных хроматографических пластинок

Рассмотренные в главе 6 приемы, направленные на увеличение эффективности разделения в колоночной хроматографии, включали использование адсорбентов с величиной зерен 2–5 мкм при малом разбросе их размеров и близкой к сферической их форме [32–41].

Такие же подходы были в той или иной степени использованы и в тонкослойной хроматографии. Целый ряд фирм приступил к производству пластинок для высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВТСХ), отличающихся следующими особенностями:

- применение мелкозернистых адсорбентов со средним диаметром зерна 5–10 мкм и менее вместо 40–100 мкм;
- использование фракций мелкозернистых адсорбентов с узким распределением размеров частиц (не более 10% отн. вместо 100% отн. и более) и часто с частицами сферической формы (рис. 6.5);
- применение более равномерных слоев с меньшей, чем ранее, толщиной (0,1–0,2 мм вместо 0,5–0,7 мм и более), закрепленных на подложке с помощью разнообразных закрепляющих агентов (гипса, крахмала и др.) [42–44].

В результате этих усовершенствований величины высоты, эквивалентной теоретической тарелке, уменьшились от 100 мкм и более до значений 15–20 мкм, так что уже при длине пробега фронта подвижной фазы всего 40–50 мм общая эффективность разделения достигает 2500–3000 т.т. и более [32–35].

Кроме улучшения качества сорбционных слоев, большую роль в достижении столь высокой эффективности сыграли усовершенствования техники нанесения проб, обеспечивающие малую ширину начальных хроматографических зон (менее 1 мм вместо обычных ранее 3–6 мм). Существенным усовершенствованиям подверглись также и методы подвода подвижной фазы, обеспечивающие строго равномерное ее распределение по всей ширине фронта. Эти усовершенствования описаны ниже.

При использовании тонкослойной хроматографии для целей анализа наркотических и допинговых средств в настоящее время чаще всего применяют готовые тонкослойные пластинки со слоями силикагеля, выпускаемые различными фирмами и организациями. В России для этой цели наиболее часто применяют пластинки отечественного производства, импортные пластинки «Сорбфил», «Силуфол», «Армссорб» и «Мерк», а также выпускаемые в Эстонии пластинки ВЭТСХ для высокоэффективной тонкослойной хроматографии.

8.2. Техника нанесения проб

В обычных вариантах тонкослойной хроматографии пробы наносят вблизи одного из краев пластинки на линии старта в форме пятен округлой формы или полос, не особенно заботясь об обеспечении минимальной ширины этих начальных зон. При нанесении проб пользуются стеклянными капиллярами подходящего размера (длина 50–80 мм, диаметр 0,3–1,0 мм), стеклянными пипетками и микрошприцами различных конструкций. Во всех случаях применение таких средств позволяет наносить пробы величиной от нескольких десятых долей микролитра до ~10 мкл в форме пятен диаметром 2–6 мм. Столь значительная начальная ширина пятен определенно затрудняет разделение близких по свойствам соединений и не позволяет обеспечить достаточно высокую эффективность применяемой хроматографической системы. Для обеспечения высокой эффективности разделения в тонкослойной хроматографии требуются значительно более точные и воспроизводимые методы и устройства для дозирования проб анализируемых веществ и их нанесения на сорбционные слои.

Простейшим из таких устройств является отрезок тонкого металлического капилляра, длина которого меньше высоты капиллярного поднятия жидкости в нем при диаметре порядка 0,1–0,2 мм. Обычно для этой цели используют отрезок тонкой трубки из платино-иридиевого сплава, нержавеющей стали или иного металла, достаточно стойкого к коррозии, прикрепленного в его средней части к какому-либо держателю (рис. 8.9). В качестве таких дозировочных капилляров могут быть использованы тонкие шприцевые иглы. Ряд фирм, специализирующихся на изготовлении химико-аналитического оборудования, выпускает наборы таких дозировочных капилляров различного объема (например, 0,05; 0,100; 0,200; 0,500 мкл). Разработаны прецизионные механические устройства, обеспечивающие строго воспроизводимое заполнение таких капилляров анализируемой жидкой пробой и их опорожнение при касании слоя адсорбента за счет капиллярного всасывания при его увлажнении. При использовании таких устройств относительное стандартное отклонение в количестве нанесенных проб анализируемых веществ может быть меньше, чем 0,025.

Несколько более сложными в эксплуатации, но и более универсальными устройствами для нанесения проб являются микрошприцы, широко используемые как в газовой хроматографии, так и в высокоэффективной колоночной жидкостной хроматографии. Для того чтобы избежать повреждения слоя адсорбента высокоэффективных тонкослойных пластинок, иглы микрошприцев объемом 1–10 мкл имеют плоский срез их свободного конца. Такие микрошприцы применяются как для ручного ввода проб, так и в сочетании с достаточно сложными механическими устройствами (аппликаторами), обеспечивающими автоматизированное нанесение большого числа проб (до 40–50 проб и более) на одну пластинку с высокой воспроизводимостью.

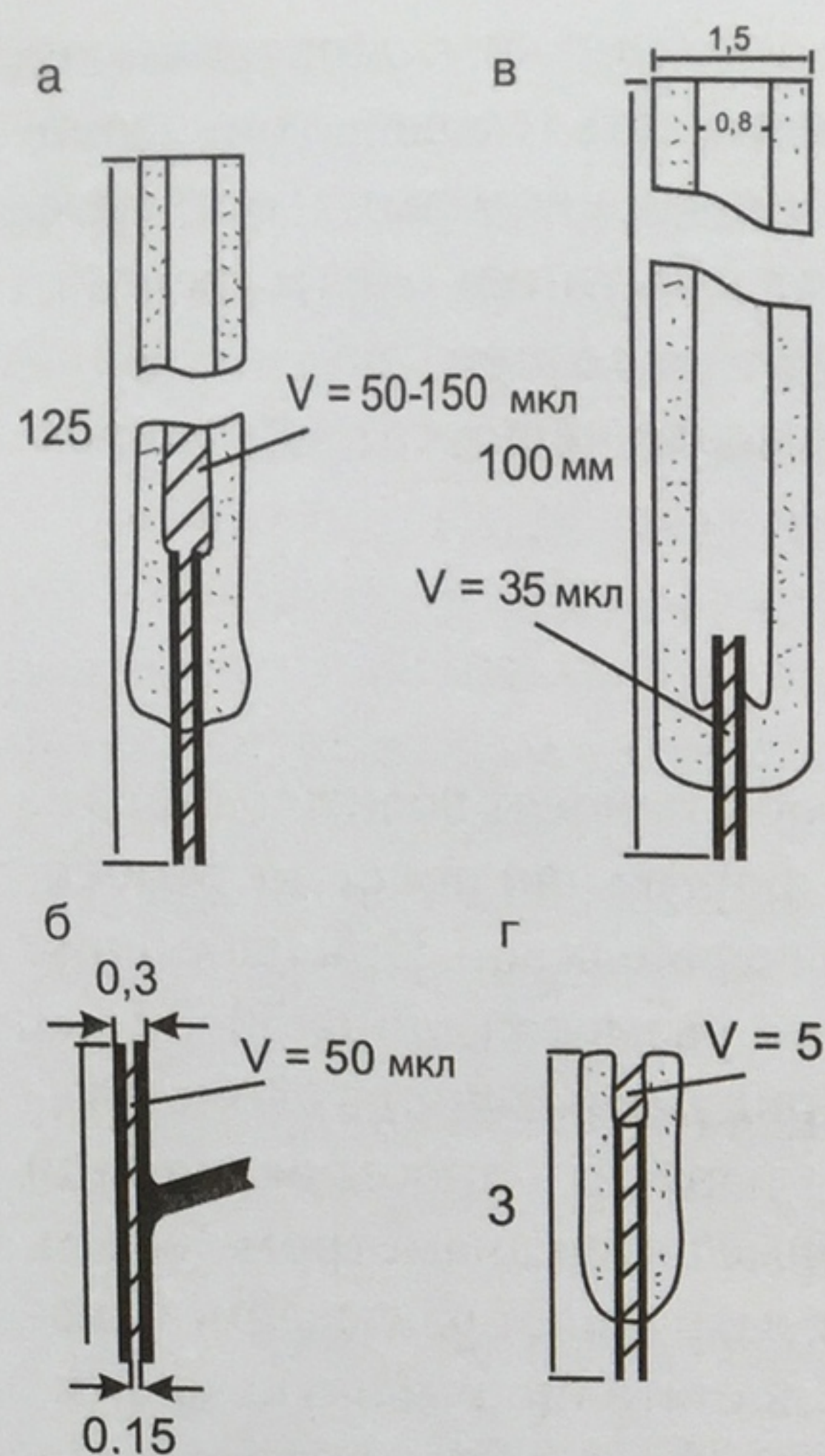


Рис. 8.9. Приспособления для нанесения проб на тонкослойные пластинки: а – платино-иридиевая игла, впаянная в стеклянный капилляр; б – самозаполняющийся платино-иридиевый капилляр; в – самозаполняющийся платино-иридиевый капилляр, впаянный в стеклянный держатель; г – самозаполняющийся платино-иридиевый капилляр, впаянный в стеклянную трубку, позволяющую контролировать процесс заполнения раствором пробы

При нанесении проб вначале на пластинке намечают линию старта, на которую и наносят пробы. Обычно такую линию намечают в 10–20 мм от одного из краев пластинки. Отмечают также и границу, которую при хроматографии должен достичь фронт подвижной фазы. Как правило, такую границу намечают в 10–15 мм от противоположного края пластинки. Эти операции несколько затруднительно выполнить без повреждения слоя адсорбента на пластинках с незакрепленным слоем. На пластинках с достаточно прочными закрепленными слоями такие линии можно без особого труда провести мягким графитовым карандашом. Обычно пробы подлежащих хроматографическому анализу веществ наносят в виде разбавленных растворов в подходящем растворителе возможно меньшей полярности, что предотвращает чрезмерное расплывание стартового пятна. Этот растворитель должен быть возможно более летучим, чтобы после нанесения пробы он мог бы быстро испариться. При необходимости процесс нанесения пробы повторяют несколько раз, нанося раствор анализируемого вещества небольшими порциями, причем каждое следующее нанесение выполняют после полного испарения растворителя от предыдущей операции. Таким путем удастся получить начальное пятно пробы диаметром менее 0,5 мм.

При медленном выполнении операции нанесения проб сорбционные свойства пластинки могут измениться вследствие воздействия диоксида углерода и влаги воздуха. Поэтому рекомендуется при выполнении операции нанесения проб на высокоэффективные тонкослойные пластинки прикрывать основную часть сорбционного слоя стеклянной, металлической или пластиковой пластинкой. Часто такая пластинка может одновременно служить шаблоном для нанесения большого числа проб [4]. Опубликованы описания полностью или частично автоматизированных устройств для нанесения большого числа проб, выпускаемых различными приборостроительными фирмами.

В ряде случаев перед выполнением хроматографического разделения проводят специальные операции, направленные на дополнительное сжатие зон уже нанесенных проб.

Так, например, проведя линию старта в 25 мм от края пластинки с силикагелем, авторы работы [36] наносили пробы на другую линию, отстоящую от края пластинки только на 10 мм. После испарения растворителя, в котором были растворены исходные пробы, край пластинки погружали на глубину 5 мм в полярный растворитель – вспомогательную подвижную фазу. При этом все компоненты анализируемых проб передвигались вместе с фронтом этой подвижной фазы. В результате этой операции первоначально нанесенные зоны проб, имевшие круглую форму, сжимались в очень узкие полоски шириной всего лишь около 0,1 мм. Когда эти полоски вместе с фронтом вспомогательной подвижной фазы достигали линии старта, процесс прерывали, пластинку высушивали и помещали в камеру с основной подвижной фазой, обеспечивающей достаточно полное разделение компонентов анализируемых смесей.

Сходным образом, в работе [37] для сжатия первоначальных зон использовали процесс испарения подвижного растворителя, что приводило к концентрированию первоначально нанесенных пятен и превращению их в узкие полоски. Кроме того, для получения сильно сжатых начальных зон применяли специальные пластинки, имеющие кроме основного разделяющего сорбционного слоя силикагеля дополнительную полосу из более инертного адсорбента (кизельгура) вблизи стартового края. В процессе хроматографии исходные округлые пятна нанесенных проб претерпевали сильное сжатие при достижении ими границы слоя более активного адсорбента, после чего продвигались далее в форме узких концентрированных зон [38]. Сходные приемы были использованы позже также в работе [39].

Таким образом, для обеспечения высокой эффективности тонкослойной хроматографии можно указать следующие рекомендации, касающиеся техники нанесения проб [26].

1. Концентрация раствора анализируемого материала при нанесении проб на тонкослойную хроматографическую пластинку должна быть, по возможности, более высокой.
2. Растворитель, используемый при вводе проб, должен быть таким, в котором величины R_f для всех компонентов исследуемых проб были бы, по возможности, близки к нулю ($R_f < 0,1$), если этот растворитель использовать в качестве подвижной фазы).
3. Капилляры или иглы микрошприцев, с помощью которых проводится дозирование и нанесение проб на пластинки, должны иметь возможно меньший диаметр (менее 0,5 мм).
4. Давление дозирующего капилляра или иглы микрошприца на слой адсорбента должно быть достаточно малым, чтобы не нарушать структуру этого слоя. При существующей в настоящее время технологии приготовления пластинок для высокоэффективной жидкостной хроматографии слои адсорбентов выдерживают без разрушения давление порядка 100 г/мм². Это соответствует нагрузке примерно 7 г при диаметре капилляра или иглы 0,3 мм.

При использовании для нанесения проб металлических капилляров постоянного объема воспроизводимость количества нанесенных проб весьма высока и соответствует величине относительного стандартного отклонения примерно 0,007.

Применение описанных здесь приемов позволяет обеспечить достаточно малую ширину начальных зон, обеспечивающую эффективность хроматографического разделения компонентов пробы с $0,2 < R_f < 0,8$ порядка 10^4 т.т. и более.

8.3. Усовершенствованные способы подвода элюента

Для обеспечения высокоэффективного разделения в тонкослойной хроматографии элюент должен поступать с большой равномерностью по всей ширине тонкослойной пластинки. Как правило, это достигается путем погружения края пластинки, вблизи которого нанесены пробы, в элюент на глубину 3–5 мм или путем приведения этого края пластинки в соприкосновение с пористым материалом, пропитанным элюентом, как показано на рис. 8.8б.

Смачивающая сорбционный слой подвижная фаза вначале заполняет более узкие поры слоя и лишь несколько позже – более широкие поры. С другой стороны, по мере продвижения фронта растворителя по слою увеличивается сопротивление потоку. Расстояние, пройденное фронтом подвижной фазы, связано с временем, прошедшим с начала процесса проявления хроматограммы, квадратичной зависимостью

$$z^2 = \chi t \quad (8.1)$$

где z – расстояние, пройденное фронтом подвижной фазы за время t , а χ – константа для данных условий течения [40, 41]. Скорость движения фронта при этом равна

$$\frac{\partial z}{\partial t} = \frac{\chi}{2z} \quad (8.2)$$

Следовательно, скорость подвижной фазы в тонкослойной хроматографии в отличие от колоночной хроматографии убывает обратно пропорционально расстоянию, пройденному фронтом, так что для продвижения фронта на удвоенное расстояние потребуется вчетверо больше времени.

Вследствие этих закономерностей скорости подвижной фазы в тонкослойной хроматографии очень малы по сравнению с высокоэффективной жидкостной хроматографией в колонках. Тем не менее скорости в большинстве случаев превышают величины, соответствующие минимуму на кривых Ван-Деемтера, так что роль продольной молекулярной диффузии в расширении хроматографических зон остается подчиненной.

Константа χ для единичного тонкого капилляра равна [41, 42]

$$\chi = kr \frac{\gamma}{\eta} \quad (8.3)$$

где k – проницаемость капилляра; r – его радиус; γ – поверхностное натяжение жидкости и η – ее вязкость.

Применительно к процессу тонкослойной хроматографии, когда сорбционный слой можно рассматривать как совокупность большого числа извилистых капиллярных каналов, пронизывающих слой плотных частиц, это уравнение может быть записано в следующей форме [41, 43]

$$\chi = 2k_r d_p \frac{\gamma}{\eta} \quad (8.4)$$

где k_r – параметр, характеризующий проницаемость слоя и зависящий от его структуры и плотности, шероховатости и формы слагающих его частиц диаметра d_p . Показано, что это уравнение достаточно хорошо выполняется для плотных частиц сферической формы.

Таким образом, с точки зрения гидродинамики потока для тонкослойной хроматографии с подачей подвижной фазы за счет капиллярных сил более выгодно применять растворители с высоким поверхностным натяжением, и по-возможности, с малой вязкостью. Эти параметры сопоставлены в табл. 8.1 для некоторых растворителей, применяемых в тонкослойной хроматографии наиболее часто. Из данных табл. 8.1 видно, что с точки зрения скорости продвижения за счет капиллярных сил вдоль слоя мелкозернистого адсорбента наилучшими растворителями оказываются ацетонитрил, вода, ацетон и диэтиловый эфир. Именно эти растворители в настоящее время используются в тонкослойной хроматографии в качестве подвижных фаз наиболее часто.

При обычных способах подачи подвижной фазы на сорбционный слой посредством погружения в растворитель нижнего края пластинки или путем тесного соприкосновения слоя адсорбента с пористым материалом, через который поступает подвижная фаза, возможно неравномерное смачивание слоя по ширине пластинки. Это приводит к искажению линии фронта подвижной фазы и к нарушениям формы пятен или начальных линейных зон разделяемых компонентов, что, естественно, приводит к снижению эффективности хроматографического разделения. Для устранения этого нежелательного явления всю плоскость адсорбционного слоя на пластинке разделяют на узкие полоски, причем в начале каждой из этих полосок оставляют лишь тонкие перемычки, на которые наносят исходные зоны анализируемых проб. Через эти же перемычки далее подается подвижная фаза (рис. 8.10). Обычно при этом по окончании проявления хроматограммы образуются узкие слегка изогнутые зоны, обращенные выпуклой стороной в направлении движения подвижной фазы.

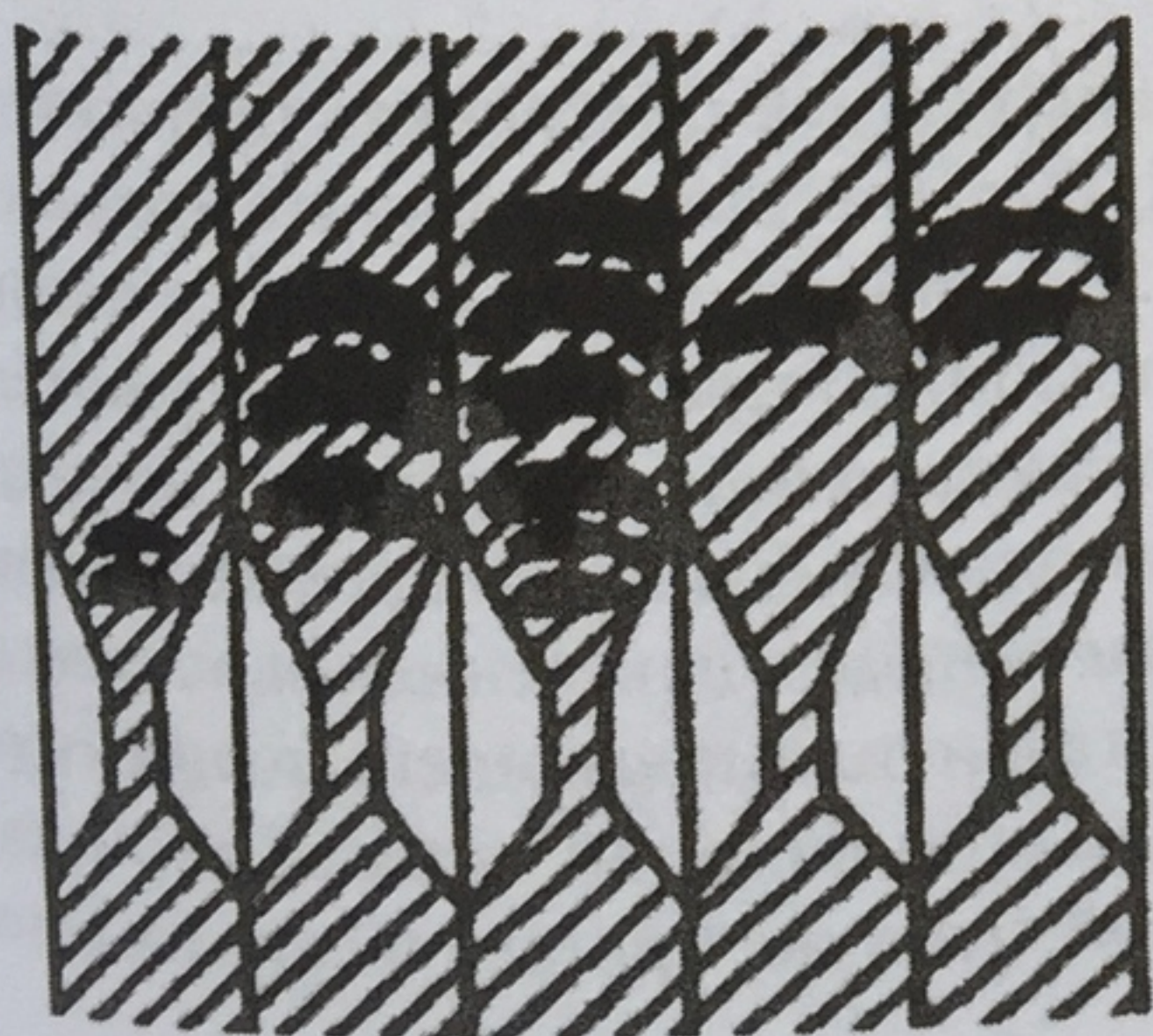


Рис. 8.10. Разделение кортикостероидов на тонкослойной пластинке с полиамидным адсорбентом в системе хлороформ–этанол (39:1):
 1 – тетрагидрокортисол, тетрагидрокортисон;
 2 – кортизол, кортизон, альдостерон;
 3 – тетрагидрокортисол, тетрагидрокортисон, кортизол, кортизон, альдостерон; 4 – альдостерон;
 5 – альдостерон, 11-дегидрокортикостерон [5].

Таблица 8. 1. Физические свойства некоторых растворителей, применяемых в тонкослойной хроматографии

Наименование растворителя	Вязкость η , сПз	Поверхностное натяжение γ , дин/см	Отношение γ/η (10^3)
1	2	3	4
Диэтиловый эфир	0,23	17,0	7,4
n-Пентан	0,23	16,0	7,0
n-Гексан	0,32	18,4	5,8
n-Гептан	0,40	20,4	5,1
Ацетон	0,32	23,7	7,4
Ацетонитрил	0,37	29,3	7,8
Вода	1,00	73,05	7,3
Дихлорметан	0,43	26,5	6,2
Тетрагидрофуран	0,47	26,4	5,6
Этилацетат	0,45	23,9	5,3
Хлороформ	0,57	27,1	4,8
Толуол	0,58	28,3	4,8
Бензол	0,64	28,9	4,5
Метанол	0,56	22,6	4,1
Этанол	1,17	22,7	2,0
Циклогексан	1,23	34,5	2,8
Четыреххлористый углерод	0,95	26,9	2,8
Трифтортрихлорэтан-1,1,2 (фреон 113)	0,69	17,3	2,5
Уксусная кислота (96%)	1,26	27,8	2,2
Диоксан	0,95	26,0	2,7
Пиридин	0,95	38,0	4,0

Высокую равномерность подачи подвижной фазы удается обеспечить при методе круговой тонкослойной хроматографии [26, 47–49]. В простейшем варианте этот способ осуществляют, как показано на рис. 8.5 и 8.11. Растворитель помещают в чашку Петри слоем глубиной 3–4 мм. В центре чашки с помощью проволоочного держателя устанавливают вертикально фитиль из хлопчатобумажного или стеклянного волокна (рис. 8.11). Чашку Петри, которая в этом случае выполняет функцию хроматографической камеры, накрывают сверху тонкослойной пластинкой с нанесенными вблизи ее центра пятнами подлежащих разделению проб. Высота фитиля, подающего подвижную фазу, должна быть на 0,5–1,0 мм больше, чем глубина применяемой чашки Петри, так чтобы при установке пластинки ее сорбционный слой сразу же пришел в соприкосновение с ним.

Благодаря тому, что подвижная фаза поступает в одной точке, равномерность движения ее фронта полностью определяется степенью однородности сорбционного слоя, которая в современных пластинках промышленного изготовления весьма высока.

Более совершенный вариант круговой тонкослойной хроматографии осуществляется в так называемых U-камерах, различные образцы которых выпускаются несколькими приборостроительными фирмами. Схема одной из ранних конструкций такой

камеры приведена на рис. 8.11.в. Хроматографическую пластинку помещают сорбционным слоем вниз на верх камеры, а подвижную фазу подают снизу в центр пластинки с желаемой скоростью с помощью микронасоса. Анализируемые пробы либо вносят в центр пластинки с помощью того же микронасоса или микрошприца, либо предварительно до начала опыта наносят в форме пятен по окружности, недалеко отстоящей от центра пластинки. В этом случае, используя пластинки размером 100×100 мм, можно одновременно анализировать до 40–50 проб, что является серьезным преимуществом этого варианта хроматографии перед всеми другими. Типичные примеры круговых хроматограмм приведены на рис. 8.12.

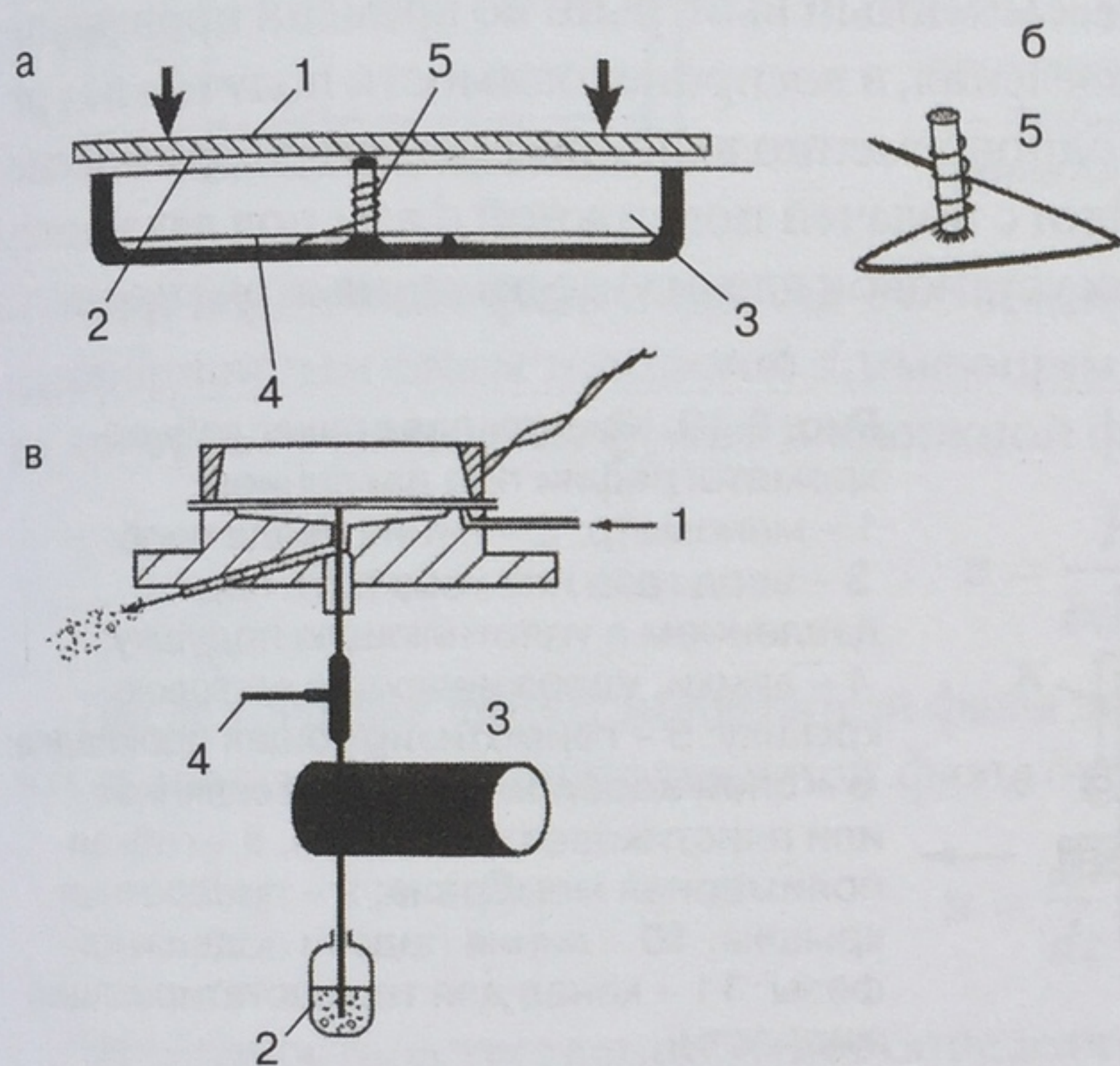


Рис. 8.11. Круговая высокоэффективная тонкослойная хроматография:

а – в простой камере (1 – пластинка; 2 – слой сорбента; 3 – камера (чашка Петри); 4 – подвижная фаза; 5 – фитиль из хлопкового волокна с проволоочным держателем, показанный отдельно на рисунке б); в – U-камера фирмы «Камаг» (Швейцария): 1 – ввод азота (сухого или насыщенного парами подвижного растворителя); 2 – подвижная фаза; 3 – насос для подачи подвижной фазы; 4 – устройство ввода проб; 5 – кольцевой нагреватель

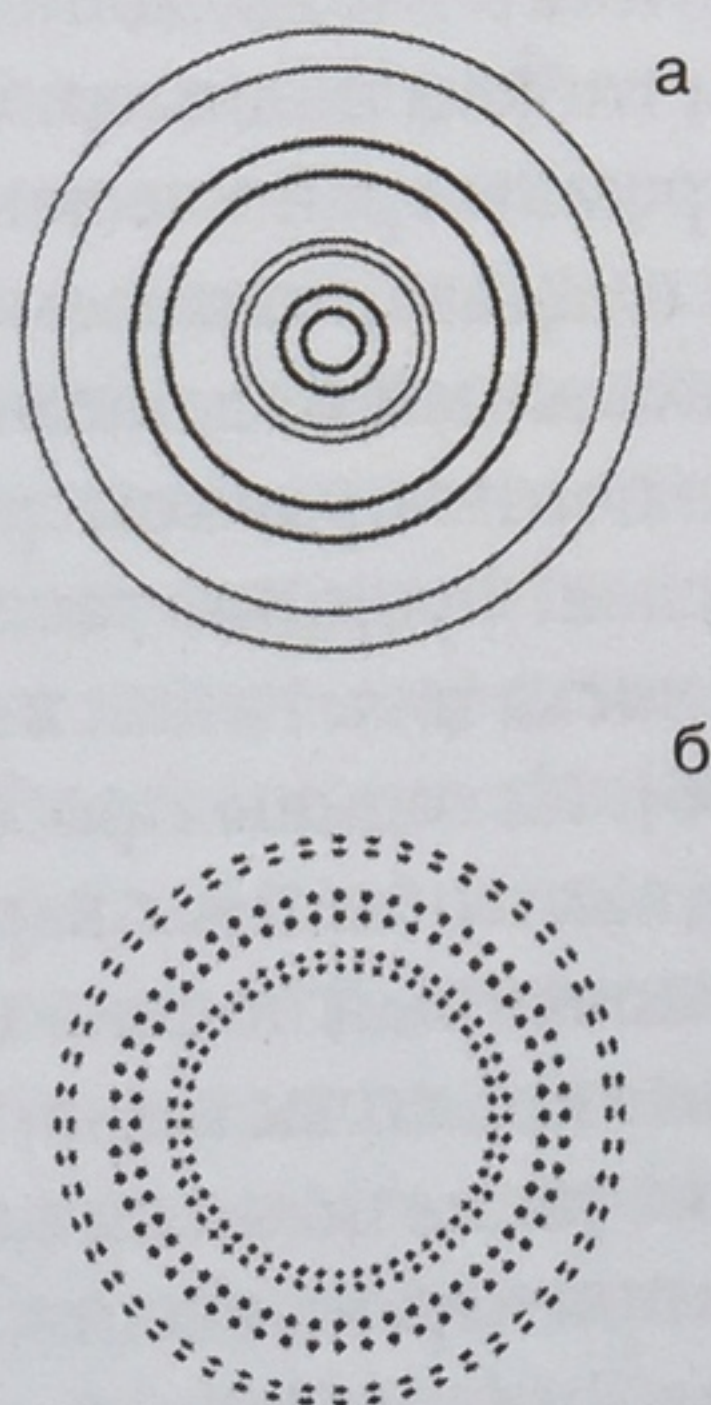


Рис. 8.12. Круговые тонкослойные хроматограммы: а – при нанесении одной пробы разделяемой смеси липофильных красителей в центр тонкослойной пластинки; б – при нанесении 40 точечных проб того же состава по окружности диаметром 15 мм

Предполагая, что размер зерна адсорбента составляет 5–10 мкм, можно вычислить по формулам, приведенным в предыдущей главе, оптимальные скорости подвижной фазы, приняв некоторые средние значения коэффициентов диффузии в жидкости. Такие расчеты показывают, что оптимальными при указанных размерах частиц адсорбента оказываются скорости подвижной фазы, равные 0,006–0,15 мм/сек. Эти величины хорошо согласуются

ся с результатами работы [49], в которой указаны величины оптимальной скорости, равные 0,10–0,28 мм/сек. В то же время скорость перемещения фронта подвижной фазы под действием только сил капиллярного всасывания уже через 5–7 мин после начала процесса падает ниже 0,1 мм/сек [10]. Для обеспечения оптимальных условий разделения было бы желательно поддерживать скорость движения подвижной фазы постоянной в пределах, близких к оптимуму, т.е. равной 0,18–0,22 мм/сек. Это обеспечило бы высокую эффективность хроматографического разделения при хорошей воспроизводимости получаемых результатов. Понятно, что такой процесс неизбежно требует применения закрытой хроматографической системы. Это, по-существу, устраняет одно из важных преимуществ планарной хроматографии. Тем не менее несомненный выигрыш во времени проведения анализа, в достигаемой эффективности разделения, в воспроизводимости получаемых результатов, в производительности по числу одновременно выполняемых анализов обеспечили варианту тонкослойной хроматографии с подачей подвижной фазы под давлением известное распространение. Одна из первых установок для осуществления этого процесса была предложена в 1977 г. (рис. 8.13) [50].

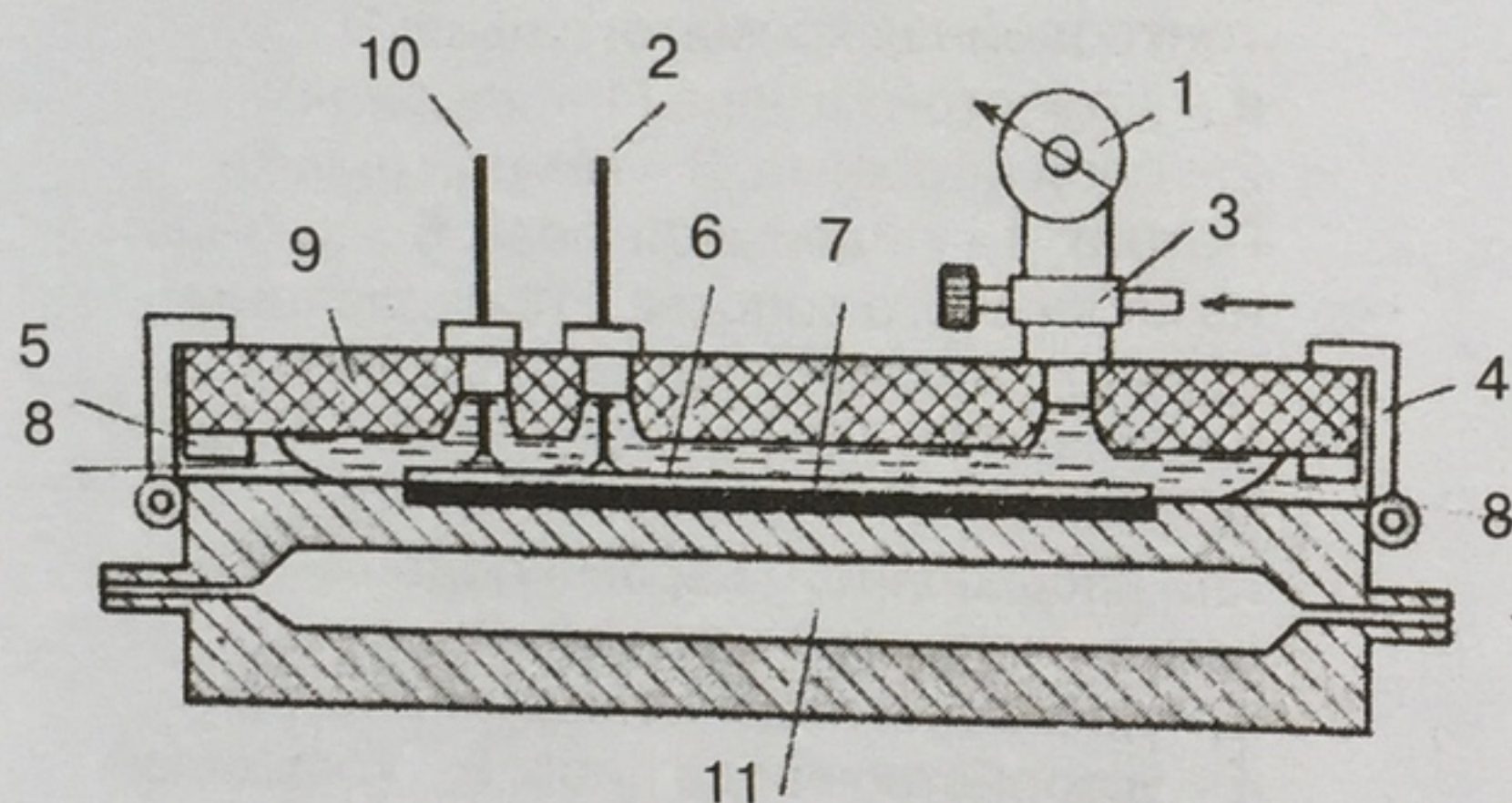


Рис. 8.13. Камера для тонкослойной хроматографии под давлением:
1 – манометр; 2 – линия ввода проб;
3 – ввод газа или жидкости под давлением в уплотняющую подушку;
4 – замки, удерживающие верхнюю крышку; 5 – герметизирующая прокладка;
6 – слой адсорбента; 7 – стеклянная или пластиковая пластинка; 8 – гибкая полимерная мембрана; 9 – прозрачная крышка; 10 – линия подачи подвижной фазы; 11 – канал для термостатирующей жидкости

В этой установке обычную тонкослойную пластинку 7 подходящего размера плотно прижимают к основанию установки под действием гибкой полимерной мембраны 8. Эта мембрана прижимается к адсорбционному слою хроматографической пластинки давлением вспомогательной жидкости (например, воды) или газа, подаваемого через вентиль 3. Ввод подвижной фазы осуществляется через специальный подающий патрубок, соединенный с распределительным каналом, обеспечивающим равномерное распределение подвижной фазы по всей ширине адсорбционного слоя. Функцию такого распределительного канала может выполнять узкая поперечная полоска пластинки шириной 1,0–1,5 мм, с которой предварительно удален адсорбент [64–66]. Исходные пробы наносят на стартовую линию на пластинке до начала эксперимента, как в обычных вариантах тонкослойной хроматографии, либо они могут вводиться на смоченный подвижной фазой слой уже после начала подачи растворителя [52, 53]. На боковые края пластинки и на ее задний край по направлению движения подвижной фазы наносят узкие полоски непроницаемого для подвижной фазы герметизирующего материала (например, коллодия, эпоксидной смолы или парафина в случае водных подвижных фаз (рис. 8.14) [54].

Применение гибкой герметизирующей мембраны, прижимаемой к адсорбционному слою давлением вспомогательного газа или жидкости, является, несомненно, остроумным методическим решением, обеспечивающим достаточно полную герметизацию как всей плоскости адсорбционного слоя, так и его задней и боковых кромок даже и без нанесения герметизирующих полосок. Это делает метод тонкослойной хроматографии под давлением достаточно простым и удобным для практического применения.

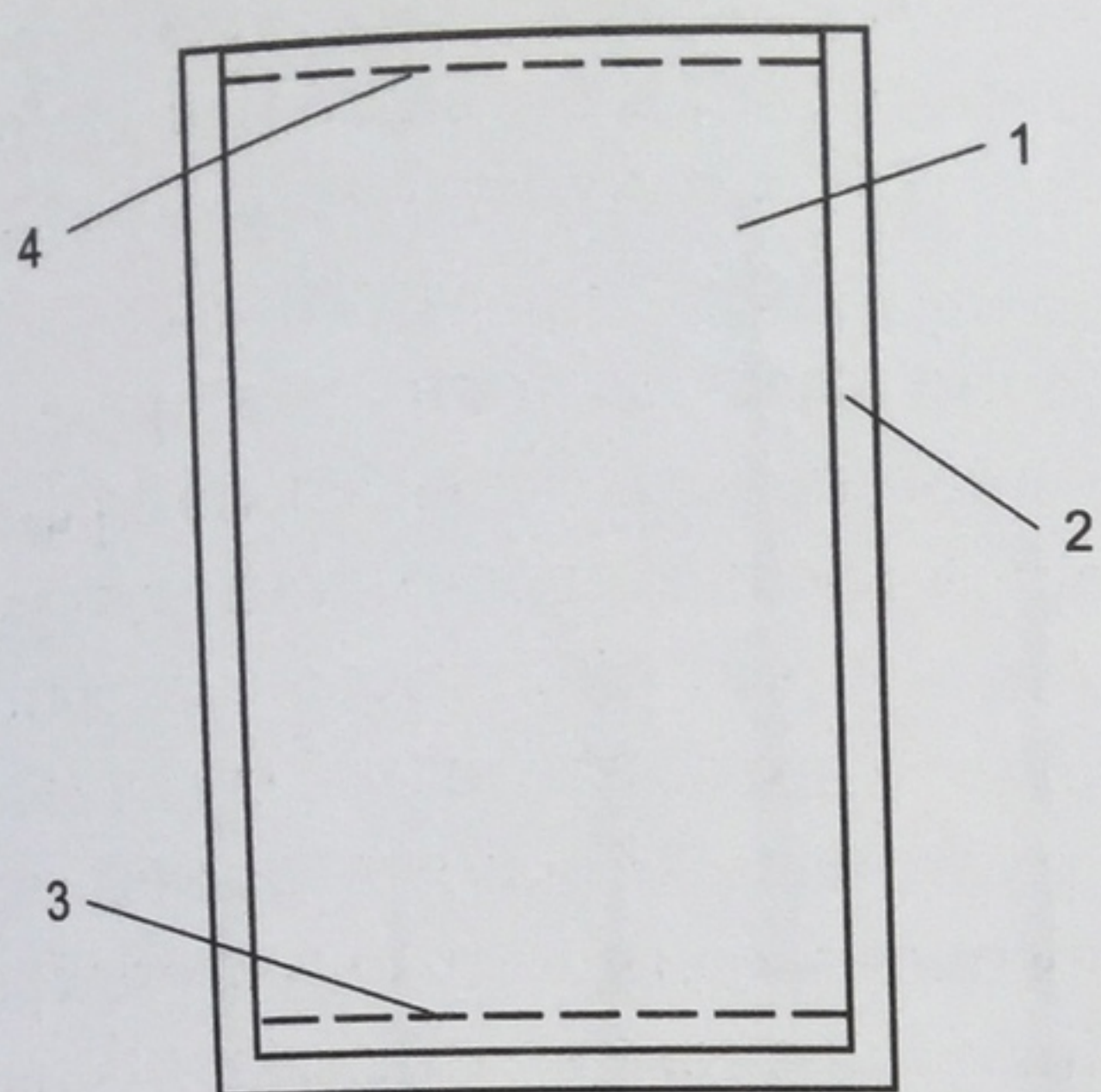


Рис. 8.14. Пластика для высокоэффективной тонкослойной хроматографии под давлением:
1 – основной слой сорбента;
2 – непроницаемые для подвижной фазы полосы на боковых и одной из торцевых сторон пластики, образованные путем пропитки слоя сорбента коллодием или эпоксидной смолой; 3 – линия старта;
4 – фронт подвижной фазы в конце хроматографического опыта

Если подвижная фаза подается с объемной скоростью F на пластинку шириной b с адсорбционным слоем толщиной d , имеющим долю свободного объема β , то расстояние z , на которое продвинется фронт подвижной фазы за время t , будет равно [51]

$$z = \frac{F}{bd\beta} t \quad (8.5)$$

После того, как фронт подвижной фазы достигнет переднего края пластики, линейная скорость движения подвижной фазы будет равна

$$u = \frac{dz}{dt} = \frac{F}{bd\beta} \quad (8.6)$$

Эта скорость, естественно, будет определяться, как и в обычной хроматографической колонке, начальным давлением, которое в описанных в литературе примерах применения тонкослойной хроматографии под давлением достигало 25 кг/см^2 . Эта величина должна быть меньше давления в прижимной подушке хотя бы на $3-5 \text{ кг/см}^2$. Понятно, что максимальное давление в прижимной подушке ограничивается ее механической прочностью. Линейная скорость движения подвижной фазы в тонкослойной хроматографии под давлением определяется величиной объемной скорости, которая при использовании жидкостных насосов с постоянной скоростью подачи растворителя остается одной и той же на всем протяжении хроматографического эксперимента. Входное давление при этом постепенно повышается до тех пор, пока фронт подвижной фазы не достигнет дальнего края пластики, и далее остается постоянным. Как видно из уравнения (8.6), линейная скорость подвижной фазы в этом варианте хроматографии остается постоянной в отличие от тонкослойной хроматографии с подачей подвижной фазы за счет капиллярных сил, где эта скорость убывает пропорционально пройденному фронтом расстоянию. Это обуславливает существенное сокращение времени элюирования. С другой стороны, эффективность хроматографического разделения также остается постоянной (рис. 8.15) [52, 53].

Эксперименты показали, что оптимальная скорость потока подвижной фазы в тонкослойной хроматографии под давлением составляет $0,15-0,25 \text{ мм/сек}$. Эти величины заметно превышают скорости движения подвижной фазы в слоях адсорбентов под действием капиллярных сил, но оказываются довольно легко достижимыми в тонкослойной хрома-

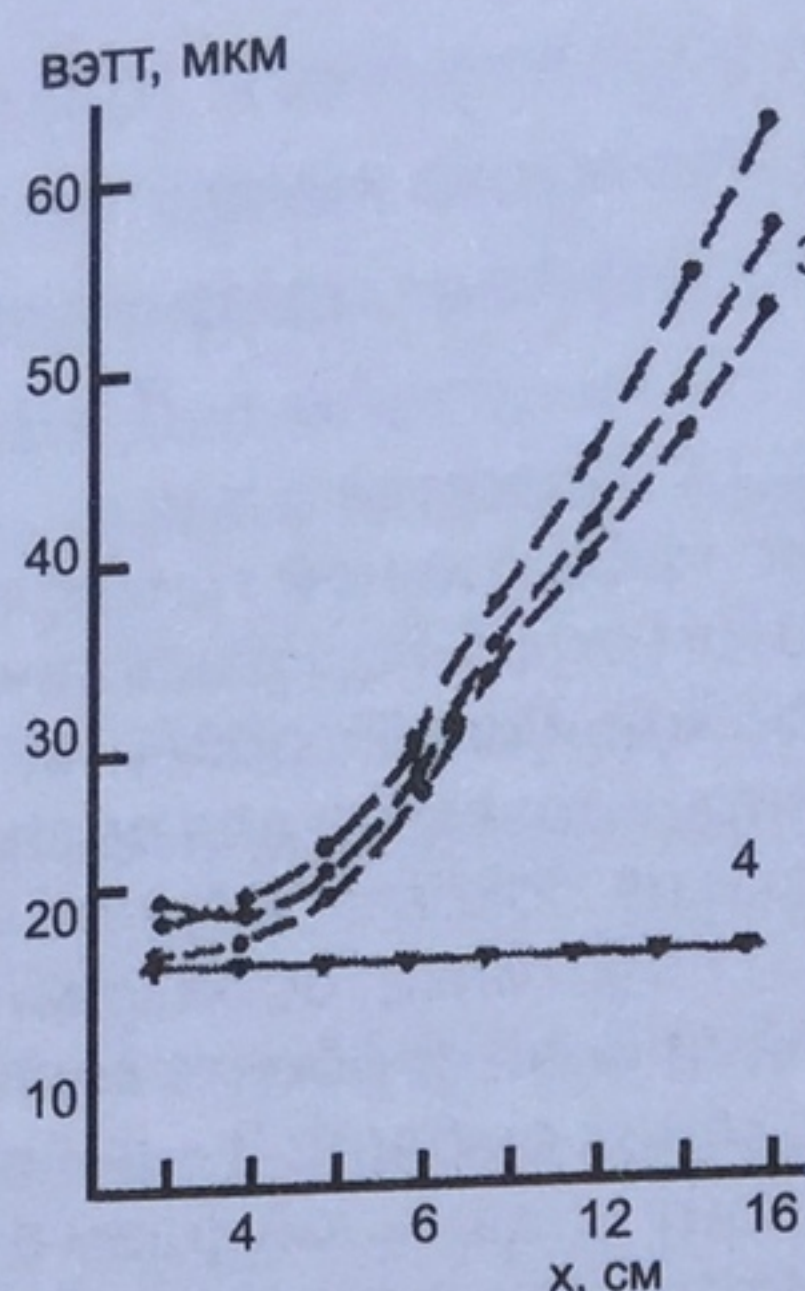


Рис. 8.15. Зависимость ВЭТТ от расстояния, пройденного фронтом подвижной фазы в условиях высокоэффективной тонкослойной хроматографии: 1 – ненасыщенная камера; 2 – ультрамикрокамера; 3 – насыщенная камера; 4 – высокоэффективная тонкослойная хроматография под давлением. Адсорбент – силикагель 60 с размером зерна 5 мкм; подвижная фаза – хлористый метилен; хроматографируемое вещество – краситель Масляный желтый

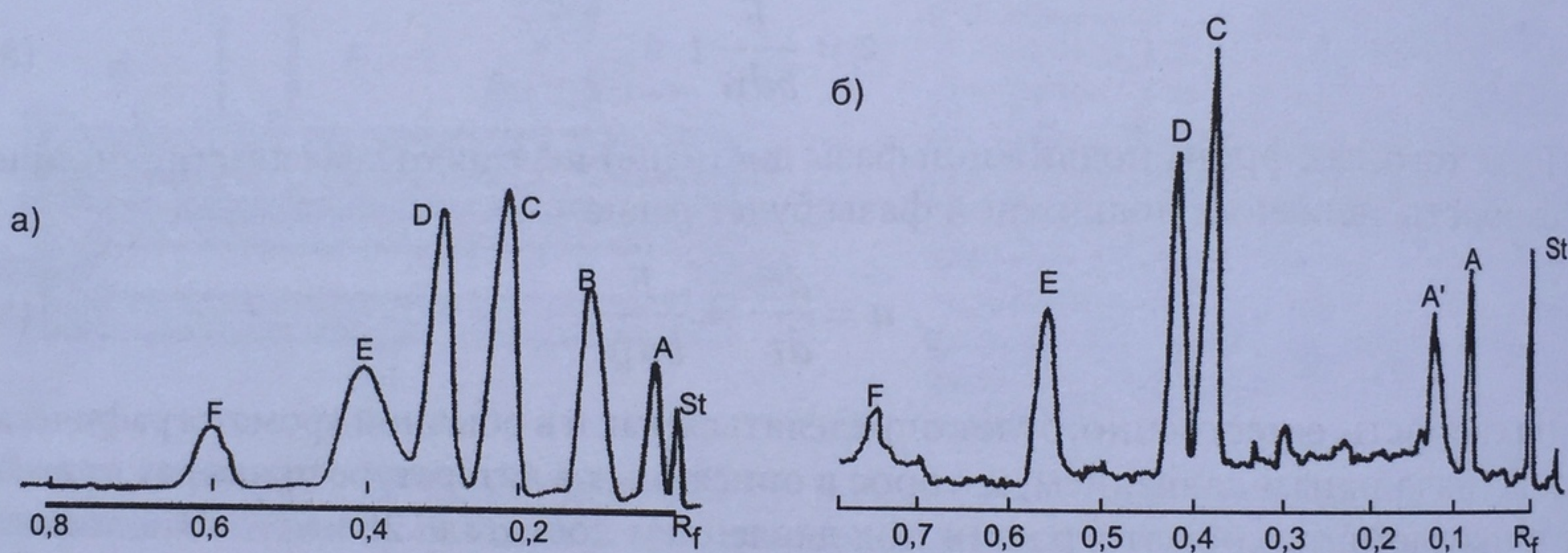


Рис. 8.16. Хроматограммы стандартной смеси красителей (фирма «Камаг») при разделении в потоке под действием капиллярных сил (а) и под давлением в камере «Хромопресс», при скорости подвижной фазы 2,3 см/мин (б)

тографии под давлением. В сочетании с высококачественными пластинками это обеспечивает возможность достижения полной эффективности разделения до 10–15 тыс. теор. тарелок (рис. 8.16) [54], включая наркотики и стероидные гормоны [78, 79, 84].

Помимо улучшения качества достигаемого разделения, метод тонкослойной хроматографии под давлением позволяет устранить ряд затруднений, связанных с осуществлением обращенно-фазовых процессов разделения. Затрудненная смачиваемость обращенно-фазовых сорбентов водными подвижными фазами в ряде случаев сильно ограничивает возможности применения обычной тонкослойной хроматографии с подачей подвижной фазы за счет капиллярных сил. Эти трудности успешно преодолеваются при использовании тонкослойной хроматографии под давлением.

Все рассмотренные выше особенности обуславливают перспективность и определенное распространение этого варианта планарной хроматографии. Метод тонкослойной хроматографии под давлением был успешно применен при анализе смесей органических кислот и их производных [55], аминокислот [51–59] афлатоксинов [60], алкалоидов и фармацевтических препаратов [61], красителей [62], продуктов растительного проис-

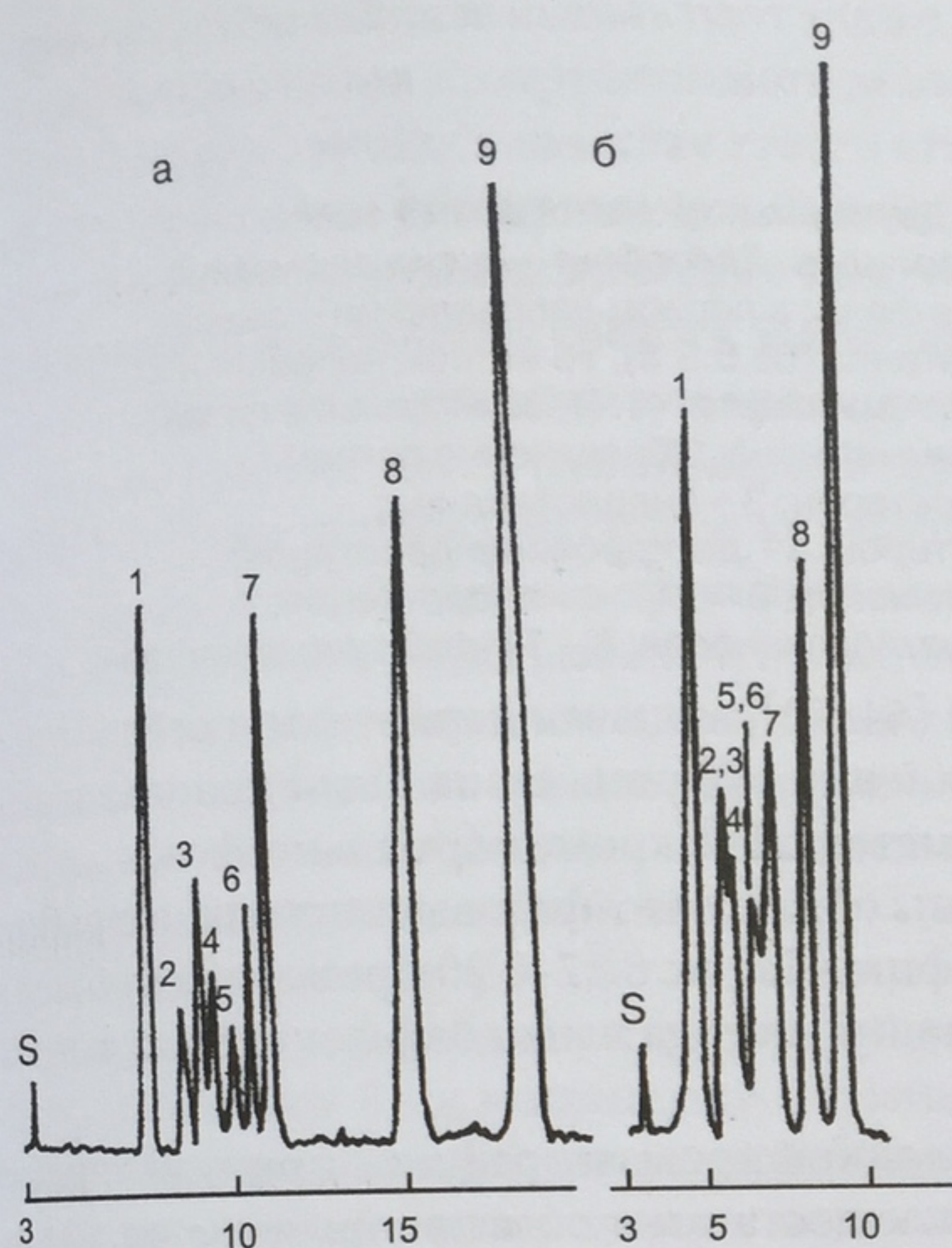


Рис. 8.17. Хроматограммы лекарственных и наркотических веществ, полученные методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии под давлением (а) и обычной тонкослойной хроматографии (б):
1 – стрихнин; 2 – эфедрин; 3 – метамфетамин; 4 – фенметразин; 5 – метилфенидат; 6 – амфетамин; 7 – дезопинон; 8 – корамин; 9 – кофеин; S – старт хроматограмм. Адсорбент – силикагель 60 (фирма «Мерк», Германия); подвижная фаза – смесь *n*-бутанол–хлороформ–метилэтилкетон–уксусная кислота (25:17:8:6).

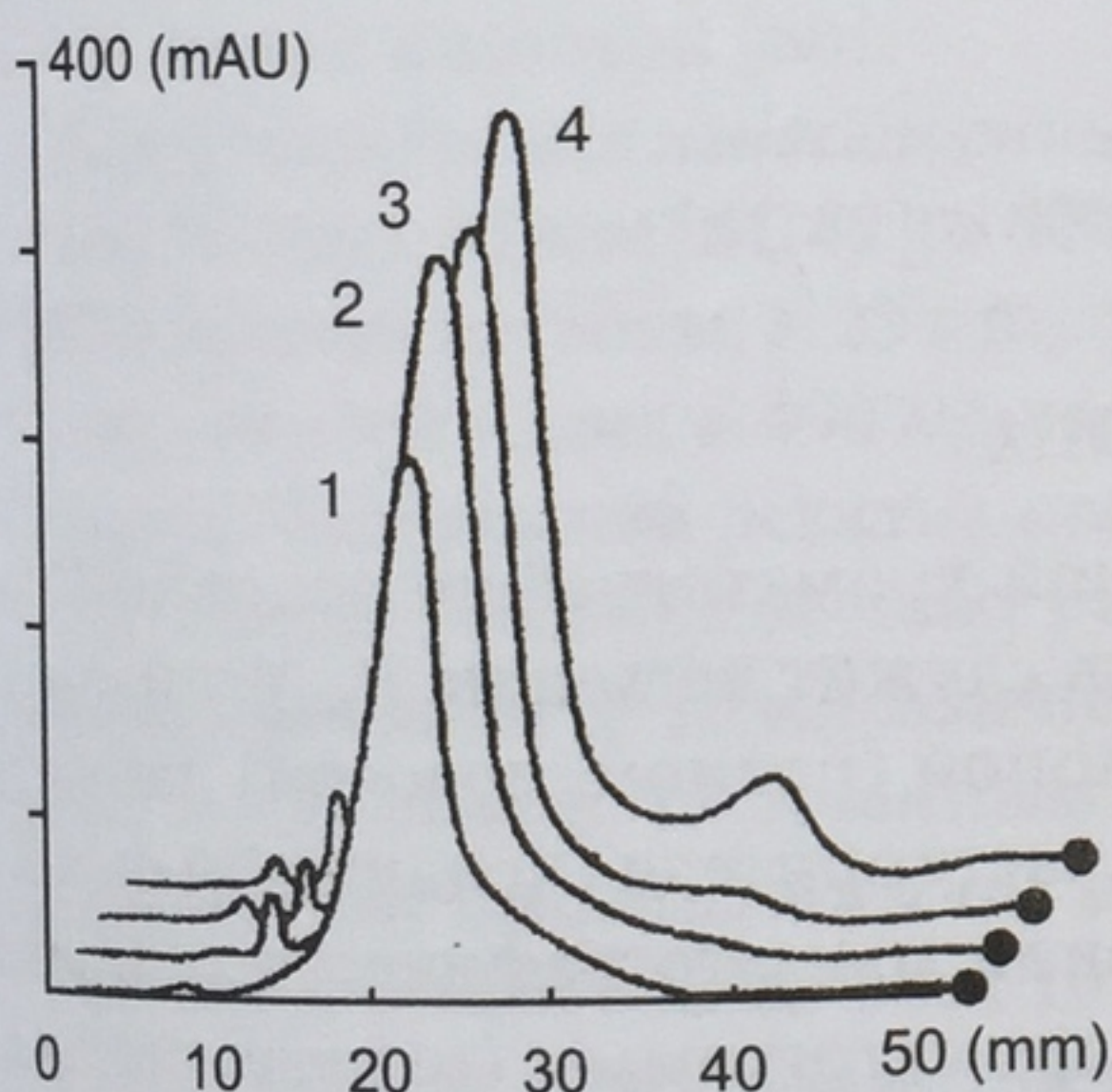


Рис. 8.18. Тонкослойные хроматограммы смесей амфетанила и родственных соединений:
1 – амфетанил; 2 – амфетанил + 1% амфетамин + 1% бензальдегида; 3 – амфетанил + 3% амфетамин + 3% бензальдегида; 4 – амфетанил + 10% амфетамин + 10% бензальдегида. Пластины для высокоэффективной тонкослойной хроматографии с силикагелем, модифицированным цианопропильными группами (фирма «Мерк», Германия); подвижная фаза – смесь *n*-гексана и метил-трет.бутилового эфира (9:1); УФ-детектирование в отраженном свете при 260 нм.

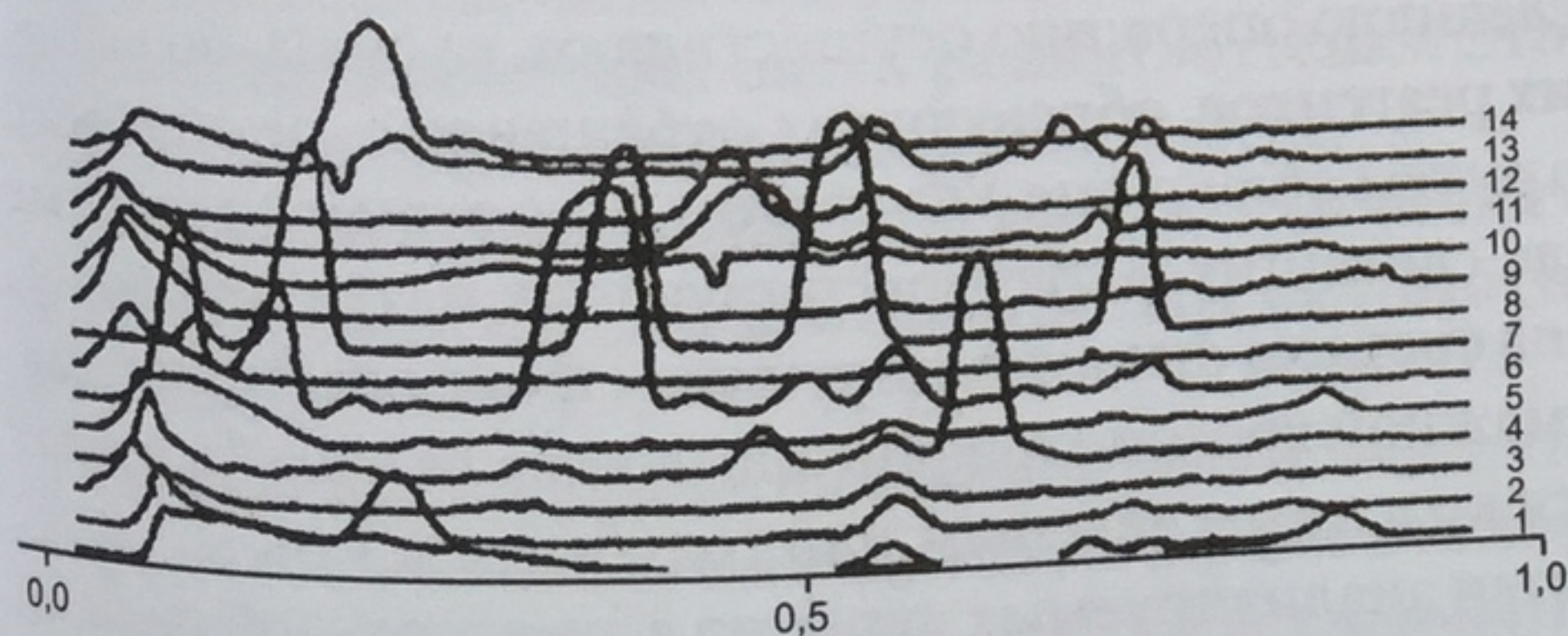


Рис. 8.19. Тонкослойные хроматограммы 13 экстрактов печени, содержащих следы наркотических веществ. Хроматограмма 8 – смесь 4 стандартных соединений. УФ-детектирование при 220 нм. Стекланные пластинки размером 10x20 см; адсорбент – силикагель 60 F254 (фирма «Мерк», Германия); подвижная фаза – смесь толуол–ацетон–этанол–25%-ный аммиак (45:45:7:3).

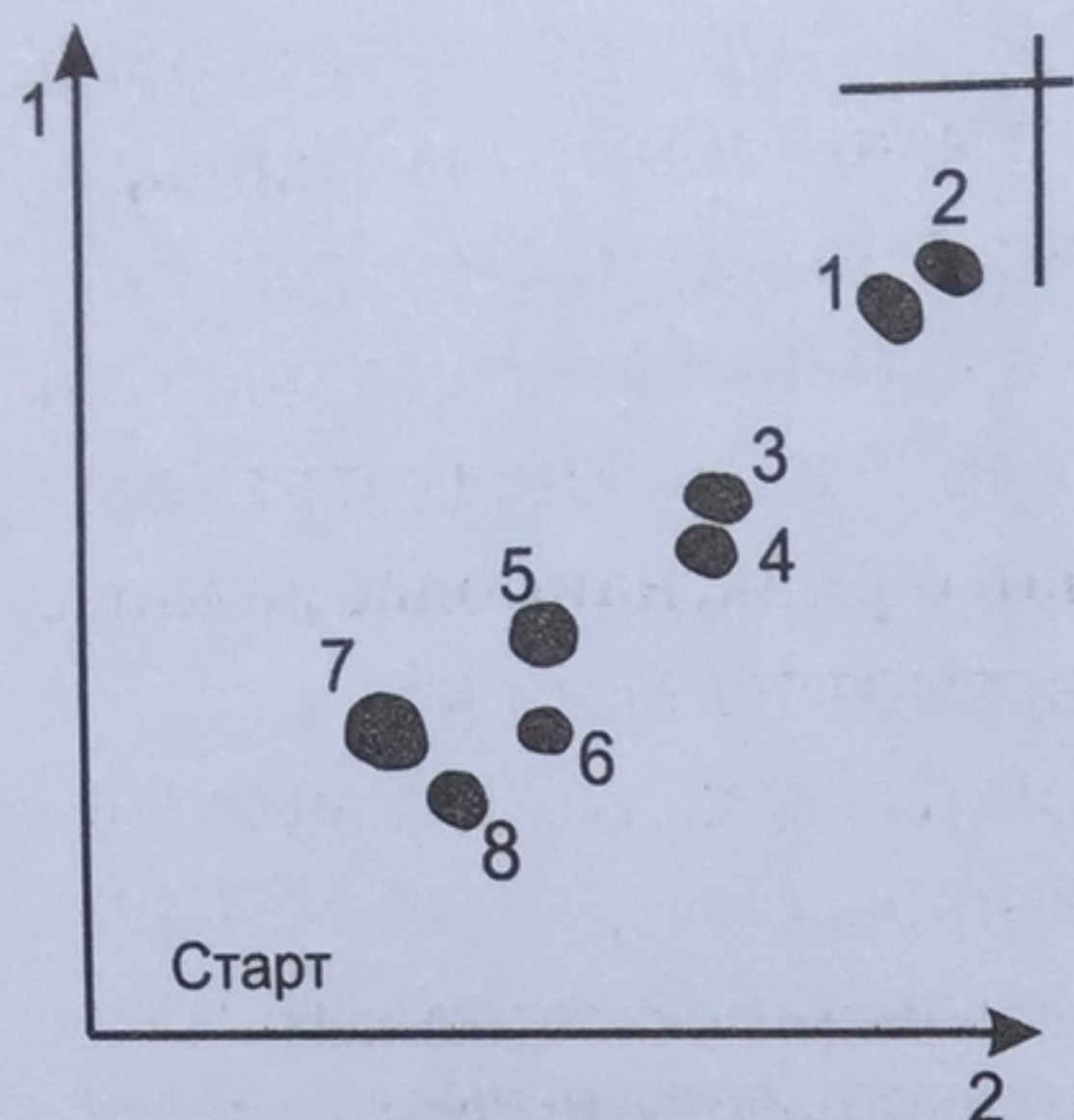


Рис. 8.20. Двумерная хроматограмма смеси 17-кетостероидов. Адсорбент – оксид алюминия; подвижные фазы: в первом направлении – смесь бензол–метанол (65.5:3.5), во втором направлении – смесь эфир–этилацетат (1:1); обнаружение пятен – реактив Циммермана. Обозначение пятен: 1 – 4-андростерон; 2 – андростандиол; 3 – андростерон; 4 – дегидроэпиандростерон; 5 – этиохоланолол; 6 – 11-оксиандростерон; 7 – 11-кетоэтиохоланолон; 8 – 11-оксиэтиохоланолон.

хождения [63] и многих других соединений [64–73], включая наркотики и стероидные гормоны (рис. 8.17) [78, 79, 84]. При выполнении этих анализов были использованы различные варианты хроматографического метода. Так, кроме нормально-фазовых разделений, в работах [66–68] были использованы обращенно-фазовые системы, а в работе [72] применяли ионообменную хроматографию. На рис. 8.17–8.20 приведены примеры хроматограмм, полученных при использовании метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии.

Разнообразные варианты метода тонкослойной хроматографии с принудительной подачей подвижной фазы, их преимущества, недостатки и области применения достаточно подробно рассмотрены в обзоре [79]. Устройства, необходимые для осуществления высокоэффективной тонкослойной хроматографии с подачей подвижной фазы под давлением, выпускаются целым рядом организаций.

8.4. Качественный анализ с помощью планарной хроматографии

В бумажном и тонкослойном вариантах планарной хроматографии основной качественной характеристикой анализируемых веществ служит величина R_f , равная отношению пути, пройденного хроматографической зоной (пятном, полосой) данного соединения, к величине пути, пройденного фронтом растворителя (подвижной фазы). Обычно обе эти величины измеряются после окончания хроматографического опыта, то есть после того, как были проведены проявление хроматограммы (разделение анализируемых веществ в потоке подвижной фазы) и визуализация зон (пятен или полос) разделенных компонентов. Эту последнюю операцию осуществляют, как указано выше, действием тех или иных химических реагентов, образующих окрашенные соединения с разделенными соединениями, либо путем облучения УФ-светом. При этом разделенные вещества могут наблюдаться в виде светящихся флуоресцирующих пятен или полос, либо, наоборот, в виде темных зон на светлом флуоресцирующем фоне пластинки. Так, например, разделенные методом бумажной хроматографии алкалоиды раувольфии дают в УФ-свете яркие пятна, светящиеся красивым зеленым или голубым светом.

Величина R_f , форма и окраска пятен анализируемых веществ в значительной степени зависят от характера применяемого адсорбента, его влажности, состава используемой подвижной фазы, типа визуализирующего реактива и от условий обработки бумажной хроматограммы или тонкослойной пластинки. Кроме величины R_f , в качественном ток-

психологическом анализе используют также величины R_f , которые представляют собой отношения значений R_f определяемого вещества и соединения, принятого за стандартное. Во многих случаях в качестве такого стандартного соединения применяют амины. Опубликованы обширные сводки данных по величинам R_f и по характеру окраски пятен многочисленных химических веществ, в том числе наркотиков, психотропных препаратов и допинговых средств. Некоторые сведения такого рода, наиболее важные с точки зрения обнаружения контролируемых веществ, рассмотрены ниже.

Для выявления пятен разделенных веществ на тонкослойных пластинках могут во многих случаях использоваться те же реактивы, которые были рассмотрены в гл. 4. Однако, кроме этих реагентов, в практике тонкослойной хроматографии используют и ряд других, обеспечивающих высокочувствительное и во многих случаях достаточно селективное обнаружение пятен многочисленных лекарственных препаратов, наркотических веществ и допинговых средств. Наиболее часто для этих целей используют реактивы перечисленные ниже. Так, для обнаружения веществ основного характера чаще всего применяют следующие реактивы.

Реактив Драгендорфа: 2,6 г карбоната висмута и 7,0 г иодида натрия растворяют в 25 мл ледяной уксусной кислоты, нагретой до кипения. Раствор оставляют на ночь, фильтруют, добавляют 8 мл этилацетата и смешивают с уксусной кислотой в соотношении 1:2,5:6. Исследуемые пластинки опрыскивают этим реактивом с помощью пульверизатора в специальных камерах или в вытяжном шкафу. При этом при наличии веществ, содержащих третичный атом азота, появляются пятна, окрашенные в цвета от желтого до красно-коричневого. Интенсивность окраски увеличивается при опрыскивании 0,05 н серной кислотой [80].

Для обнаружения *ненасыщенных стероидов* можно применять реактив Драгендорфа в модификации Мунье [81, 82]: в 800 мл воды растворяют 17 г основного нитрата висмута и 200 г винной кислоты. К 25 г полученного реактива добавляют равный объем раствора 160 г иодида калия в 400 мл воды, затем добавляют еще 250 мл воды, и 50 г винной кислоты. Полученный реактив стабилен более 1 недели.

Нингидрин: к 0,2–0,3 %-ному раствору нингидрина в этиловом спирте или в изопропанолу добавляют 5–10 мл ледяной уксусной кислоты и 2–5 мл 2,4,6-коллидина. Пластинки опрыскивают полученным раствором и нагревают до 90–105° С. Аминокислоты и родственные соединения дают пятна с окраской от голубой до синей.

Иодоплатинат (смесь 5 мл 10%-ного раствора хлорида платины с 250 мл 2%-ного раствора иодида калия): позволяет обнаружить алкалоиды, фенотиазины и другие азотсодержащие соединения, содержащие четвертичные атомы азота, в количестве порядка 10 нг в виде фиолетовых пятен разного оттенка. Этот реактив позволяет выявлять вещества основного и нейтрального характера.

Реактив Манделина – раствор ванадата аммония в концентрированной серной кислоте окрашивает пятна опиатов в цвета от желтого (нарцеин) до фиолетового (морфин, ретикулин).

Реактив Марки – смесь формальдегида и концентрированной серной кислоты. Компоненты опия дают с этим реактивом лиловые или черные пятна.

Реактив FNP: к 5 мл 5%-ного раствора хлорного железа добавляют 45 мл 20%-ной хлорной кислоты и 50 мл 50%-ной азотной кислоты. При обработке этим реактивом фенотиазины проявляются в виде красных или красно-коричневых пятен.

Вещества кислотного характера могут быть выявлены с помощью водного раствора хлорного железа или раствора нитрата ртути. С трехвалентным железом вещества, содержащие фенольные гидроксильные группы, проявляются в виде синих или фиолетовых пятен. Нитрат ртути проявляет барбитураты в виде темных, постепенно светлеющих пятен.

Каждому специалисту, использующему в своей работе метод тонкослойной хроматографии, должно быть совершенно ясно, что даже при полном совпадении величин R_f , R_s и окраски пятен исследуемого вещества и стандартного соединения можно утверждать лишь о возможной идентичности этих веществ, но не об определенном и неопровержимом доказательстве природы исследуемого препарата.

Тем не менее, Комитет по токсикологическому анализу Международной ассоциации судебных токсикологов рекомендовал ряд систем тонкослойной хроматографии в качестве стандартных (точнее, предпочтительных). Некоторые из таких систем приведены в табл. 8.2. Во всех этих системах используются ненасыщенные камеры, а растворы стандартных соединений имеют концентрации порядка 2 мг/мл.

Таблица 8.2. Стандартные системы тонкослойной хроматографии по рекомендации Комитета по токсикологическому анализу Международной ассоциации судебных токсикологов [83]

Система растворителей	Стандартное соединение	Величина R_f стандартных соединений
Адсорбент-силикагель		
Метанол	Кодеин	0,20
	Тримипрамин	0,26
	Гидроксимин	0,56
	Диазепам	0,82
Метанол- <i>n</i> -бутанол, 60 : 40	Кодеин	0,22
	Дифенгидрамин	0,48
	Хинин	0,65
	Диазепам	0,85
Хлороформ-ацетон, 8 : 2	Парацетамол	0,15
	Клоназепам	0,35
	Секобарбитал	0,55
	Метилфенобарбитал	0,70
Хлороформ-ацетон 9 : 1	Гипотиазид	0,11
	Сульфатуразол	0,33
	Фенацетин	0,52
	Празепам	0,72
Этилацетат	Сульфатуразол	0,20
	Фенацетин	0,38
	Салициламид	0,55
	Секобарбитал	0,68

Этилацетат–метанол–аммиак (конц.) 80 : 10 : 5	Сульфадимезин	0,13
	Гипотиазид	0,34
	Темазепам	0,63
	Паразепам	0,81
Этилацетат–метанол–аммиак (конц.) 85 : 10 : 5	Морфин	0,20
	Кодеин	0,35
	Гидроксизин	0,53
	Тримипрамин	0,80

Адсорбент – силикагель, импрегнированный 0,1 М раствором КОН и высушенный		
Ацетон	Амитриптилин	0,15
	Прокаин	0,30
	Папаверин	0,47
	Циннаризин	0,65
Метанол–аммиак (конц.), 100 : 1,5	Атропин	0,18
	Кодеин	0,33
	Хлорпротексин	0,50
	Диазепам	0,75
Хлороформ–метанол, 9 : 1	Дезипрамин	0,11
	Физостигмин	0,36
	Тримипрамин	0,54
	Лидокаин	0,71
Циклогексан–толуол–диэтиламин, 75 : 15 : 10	Кодеин	0,06
	Дезипрамин	0,20
	Празепам	0,36
	Тримипрамин	0,62

Известное представление о том, в какой мере могут различаться величины R_f , для одних и тех же веществ при хроматографии на разных сорбентах может дать табл. 8.3.

Таблица 8.3. Величины R_f некоторых наркотических препаратов при тонкослойной хроматографии с применением разных адсорбентов

Вещество	Пластинки «Сорбфил»	Пластинки ВЭТСХ
Система растворителей: этилацетат–этанол–25%-ный аммиак, 18 : 2 : 1		
	0,20	0,17
Морфин	0,34	0,40
Кодеин	0,69	0,75
Промедол	0,73	0,80
Димедрол	0,72	0,77
Аминазин	0,66	0,74
Дипразин	0,70	0,72
Тиоридазин		

Система растворителей: бензол–этанол–диэтиламин, 9 : 1 : 1		
Эфедрин	0,41	0,50
Эфедрон	0,65	0,80
Первитин (метамфетамин)	0,42	0,54
Метадон	0,80	0,86
Система растворителей: хлороформ–изопропанол–аммиак (25%), 9 : 9 : 1		
Барбитал	0,52	0,75
Фенобарбитал	0,39	0,30
Этаминал натрия	0,80	0,65
Барбамил	0,75	0,60

Данные табл. 8.3 ясно показывают, что даже на близких по своей природе адсорбентах имеют место значительные различия в величинах R_f , что делает настоятельно необходимым обязательную сверку параметров удерживания, наблюдаемых для исследуемых веществ, с данными для заведомых препаратов.

8.5. Способы количественной обработки тонкослойных хроматограмм

В течение длительного времени обработка планарных хроматограмм (бумажных и тонкослойных) включала операции высушивания их, визуализации зон (пятен или полос) разделенных компонентов (путем обработки хроматограмм подходящим химическим реактивом или путем облучения УФ-светом) и оценку величины этих зон путем прямого измерения их площадей простейшими средствами (линейкой, планиметром и т.п.). В ряде случаев зоны разделенных веществ извлекали из адсорбента и измеряли количество полученного вещества подходящими химико-аналитическими методами. В монографиях и обзорах, посвященных бумажному и тонкослойному варианту хроматографии, детально описаны многочисленные способы обнаружения зон бесцветных соединений на планарных хроматограммах и оценки количества вещества, образующего данное пятно или линейную полосу [1, 4–9]. Большие усилия были также затрачены и для разработки способов документирования и сохранения результатов планарной хроматографии. В своем большинстве используемые для этих целей методы включали обработку полученных хроматограмм химическими реагентами путем выдерживания их в атмосфере химически активных газов или паров (аммиака, хлора, брома, иода, сероводорода, оксидов азота, формальдегида) или путем смачивания либо опрыскивания хроматограмм жидкими визуализующими реагентами (концентрированными серной или азотной кислотами, растворами гидроксидов натрия или калия, хлорида олова, нитрата серебра, хлорида железа (III), перманганата калия, нитропруссиды натрия, различных красителей и др.). Часто для указанных целей используют облучение полученных хроматограмм УФ-светом с длинами волн 254 или 360 нм.

В 60-х годах XX века на смену простым способам оценки количества вещества чисто визуальными способами или с помощью простейших измерительных средств пришли устройства, способные осуществлять сканирование выявленных хроматографических зон по величине оптической плотности или по интенсивности отраженного света. Одним из наиболее известных устройств такого рода были фотоденситометры,

выпускающиеся швейцарской фирмой «Камаг». Применение таких устройств позволило существенно повысить чувствительность, точность и воспроизводимость количественного анализа методом тонкослойной хроматографии. В сочетании с методиками высокоэффективного разделения использование таких устройств позволило получать количественные результаты, не уступающие по точности и воспроизводимости другим передовым хроматографическим методам, включая высокоэффективную жидкостную колоночную хроматографию. Именно с помощью таких систем зарегистрированы хроматограммы, приведенные в качестве примеров на рис. 8.15–8.19. Развитие вычислительной техники в конце XX века и, в частности, широкое распространение персональных компьютеров дало новые импульсы разработке техники количественного анализа в планарной хроматографии. В качестве считывающих информацию средств вместо достаточно дорогих сканирующих денситометров стали применяться малогабаритные телевизионные камеры. Для анализа даваемых ими изображений используются методы, хорошо отработанные в таких областях, как микроскопия и анализ аэрофотоснимков [84–87]. Применение компьютерной техники позволило осуществить достаточно полную автоматизацию всех операций в методах планарной хроматографии (нанесение проб, проявление хроматограмм, визуализация и получение как качественных характеристик изучаемых веществ, так и количественной информации о них). Все эти достижения сделали возможным осуществление большого числа анализов (до 100 и более) в течение ограниченного времени (например, за 1 день) с предельно обнаруживаемыми количествами отдельных компонентов порядка 10^{-12} – 10^{-15} г (рис. 8.20) при воспроизводимости как параметров удерживания, так и количественных результатов не хуже 1% отн. Такие результаты характеризуют достигнутые в настоящее время возможности современных вариантов метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии [88–90]. В то же время методы бумажной и тонкослойной хроматографии остаются примерами изящной и достаточно эффективной химико-аналитической техники, позволяющей получить достаточные для многих случаев практического использования результаты с помощью самых простых и доступных средств.

Ограниченный объем настоящей книги не позволяет здесь детально рассмотреть ряд вопросов, имеющих важное значение для успешного осуществления процесса высокоэффективной тонкослойной хроматографии. В частности, здесь не рассмотрены вопросы активности адсорбентов и зависимости этого параметра как от характера их молекулярной структуры, так и от влажности адсорбента. Вне рассмотрения остались вопросы, связанные с насыщением адсорбентов парами применяемых подвижных фаз, свойствами применяемых растворителей, в частности с их элюиционной способностью. Вне обсуждения остались также весьма плодотворные варианты метода тонкослойной хроматографии с применением градиентного элюирования с постепенным увеличением элюирующей способности применяемой подвижной фазы в процессе хроматографического опыта. В известной мере эти проблемы были рассмотрены в предыдущих главах. Лишь в малой степени здесь были затронуты вопросы техники двумерной хроматографии и многократного элюирования.

Все эти проблемы, весьма важные для успешного проведения и тонкослойной, и жидкостной колоночной хроматографии, детально рассматриваются в многочисленных книгах, посвященных обсуждаемым здесь методам [91–94]. К этим весьма обстоятельным источникам мы отсылаем заинтересованного читателя.

8.6. Метод тонкослойной хроматографии в анализе наркотических и допинговых средств

Метод ТСХ благодаря своим достоинствам получил широкое распространение в лабораторной практике судебно-медицинских экспертиз, экспертно-криминалистических исследованиях, таможенном контроле и т.д. [95]. Однако строгая идентификация наркотиков с помощью ТСХ часто затруднительна особенно при анализе объектов сложного состава, в том числе при анализе биопроб [83].

8.7. Алкалоиды мака снотворного и синтетические опиаты

В незаконном обороте наркотиков одно из первых мест занимают опий-сырец, соломка мака снотворного, их отвары, настои и экстракты.

Основной целью исследования этих объектов является установление присутствия алкалоидов – морфина, кодеина, тебаина. Перед анализом пробу предварительно обрабатывают различными способами, зависящими от природы объекта и рассмотренными в гл. 5. Полученный концентрат наносят на пластинку и хроматографируют в подвижной фазе: этилацетат – этанол – 25%-ный аммиак, 18:2:1. Для обнаружения пятен хроматограмму обрабатывают реактивом Марки. Применительно к пластинкам «Сорбфил» и «ВЭТСХ» (Эстония) получают следующие значения R_f : 0,20 и 0,17 для морфина; 0,34 и 0,40 для кодеина (пятна окрашены в фиолетово-сиреневый цвет). Эти данные соответствуют рекомендациям Комитета по систематическому токсикологическому анализу Международной ассоциации судебных токсикологов. Для других типов хроматографических пластинок в литературе описаны многочисленные методики с применением различных подвижных фаз основного и нейтрального характера и обнаруживающих цветных реагентов. В качестве примера в табл. 8.4 приведены данные обзора [96]. Для обнаружения пятен опийных алкалоидов наряду с реактивом Марки используют [97]:

- сорбенты с индикаторами, флуоресцирующими при $\lambda=254$ нм (предел обнаружения темных зон морфина, кодеина, тебаина, наркотина 0,4–0,7 мкг, папаверина – 0,1 мкг);
- собственную флуоресценцию папаверина (голубоватая) и нарцеина (голубая) при $\lambda = 365$ нм (морфин флуоресцирует после превращения его в псевдоморфин); реактив Драгендорфа (красно-оранжевые пятна на желтом фоне) и он же с последующей обработкой пластинок 0,05–0,1 н. раствором серной кислоты (красно-оранжевые зоны на светло-сером фоне); предельно обнаруживаемое количество различных опиатов от 0,01 до 2–3 мкг; гексайдодоплатинат калия, дающий с различными алкалоидами на холоде серо-голубую окраску (пределы обнаружения 0,5–1,0 мкг);
- смесь анисового альдегида с серной кислотой с последующим нагреванием пластинок при 120° С в течение 15 мин (предельно обнаруживаемые количества, морфина и кодеина 0,7, тебаина 0,4, наркотина и нарцеина 1,0 мкг) [97].

Для обнаружения фталидизохинолиновых алкалоидов опия рекомендуют также смесь реагентов, описанных в работе [98]: (I) – насыщенный метанольный раствор ацетата двухвалентной ртути; (II) – раствор анисового альдегида в серной кислоте; (III) – 10%-ный раствор фосфорномолибденовой кислоты в метаноле. Хроматограмму после удаления растворителей обрабатывают реактивом (I); после высушивания

при 80° С обрабатывают 15 мин. При сравнении используется подвижная фаза с длиной пробега R_f : наркотина 0,5–0,6; наркотина

Таблица 8.4

Алкалоид
Морфин
Кодеин
Тебаин
Папаверин
Нарцеин

Применение 4:1; (II) ламин

Для определения такой подвижной части хроматографического растворителя. Особое внимание принадлежит также внутриматричной дифференциации маков. Эти (Германия)

С целью темы толуол, представляли обработку мым количеством. Внутрифина и ф их относительная хроматографическая ацетон-этанол 1%-ным

при 80° С обрабатывают смесью 9 мл реактива (II) с 1 мл реактива (III); после чего нагревают 15 мин при 120° С.

При сравнительных анализах образцов опия различного происхождения рекомендуется использовать пластинки с флуоресцирующим слоем силикагеля (HF254 и др.) и подвижную фазу толуол-ацетон-95%-ный этанол-25% раствор аммиака, 20:20:3:1, с длиной пробега 15 см. В этих условиях опийные алкалоиды имеют следующие значения R_f : нарцеин 0,0-0,05; морфин 0,1-0,2; кодеин 0,2-0,3; тебаин 0,4-0,5; папаверин 0,5-0,6; наркотин 0,7-0,8.

Таблица 8.4. Характеристики удерживания алкалоидов опия на пластинках с силикагелем G (фирма «Мерк», Германия)

Алкалоид	R_f 100			
	Системы растворителей			
	I	II	III	IV
Морфин	12	8	8	3
Кодеин	35	15	36	38
Тебаин	65	38	64	69
Папаверин	97	77	67	73
Нарцеин	19	3	0	0

Примечания: Системы растворителей: хлороформ-метанол, 9:1; (I) бензол-этанол, 4:1; (II) хлороформ-ацетон-диэтиламин, 5:4:1; (III) хлороформ-циклогексан-диэтиламин, 7:2:1; (IV).

Для определения чистоты отдельных компонентов лучшие результаты достигаются с такой подвижной фазой, в которой пятно исследуемого алкалоида находится в средней части хроматограммы, т.е. с R_f между 0,3 и 0,7. Для морфина пригодна, например, система растворителей метиленхлорид-метанол-10%-ный раствор аммиака, 85:15:2 [97].

Особое место в криминалистических исследованиях опиатов занимает определение принадлежности растительных образцов к ботаническому виду «мак снотворный», а также внутривидовая классификация, важная с точки зрения приложения законов дифференцирующей ответственности за посев и выращивание опийного и масличного мака. Эти задачи успешно решаются с помощью ТСХ на готовых пластинках «Мерк» (Германия), «Сорбфил» и «ВЭТСХ» (Эстония).

С целью определения видовой принадлежности мака [98] алкалоиды разделяли в системе толуол-ацетон-этанол-25%-ный раствор аммиака (40:40:6:1); визуализацию осуществляли обработкой высушенных пластинок парами формальдегида с последующей обработкой реактивом Манделина. Данные по окраске пятен и предельно обнаруживаемым количествам опиатов на различных пластинках представлены в табл. 8.5 [98; 99].

Внутривидовая дифференциация мака снотворного основана на обнаружении морфина и фталидизохинолиновых алкалоидов (наркотина и нарктолина) [98] и оценке их относительных количеств. Для этого хлороформенный экстракт из соломы мака хроматографируют на пластинках «Мерк», «Сорбфил» и «ВЭТСХ» в системе толуол-ацетон-этанол-25%-ный раствор аммиака (40:40:6:2) и обрабатывают хроматограмму 1%-ным водным или спиртовым раствором диазотированного дианизидина (краситель

Прочный синий Б). Это дает возможность обнаружить фенольные основания: морфин (пятно коричневатого-желтого цвета) и наркотин (пятно пурпурно-фиолетового цвета). Затем пластинку обрабатывают реактивом Драгендорфа (в модификации Мунье), позволяющим определить нефенольные алкалоиды (пятна оранжевого цвета).

Таблица 8.5. Определение алкалоидов мака на тонкослойных пластинках при обработке формальдегидом и реактивом Манделина [100]

Алкалоид	Окраска пятен	Предельно обнаруживаемое количество веществ в пятне, мкг	
		«Мерк»	«ВЭТСХ»
Нарцеин	Желтая	5	3
Морфин	Фиолетовая	1–2	1
Кодеин	Синяя	1	0,5
Ретикулин	Фиолетовая	1	0,7
Тебаин	Оранжевая	5	2,5–3,0
Наркотин	Оранжевая	2	1
Папаверин	Синяя	2	1
Наркотин	Оранжевая	3	1

К синтетическим опиатам относятся героин (диацетилморфин), дионин (этилморфин), ацетилкодеин и некоторые другие.

В литературе [100] (см. табл. 8.6) описаны методики разделения некоторых опиатов на активированных пластинках «Силикагель G» (фирма «Мерк», Германия) с применением подвижных фаз хлороформ–циклогексан – диэтиламин, 5:4:1 (I) или смесь тех же растворителей, но в соотношении 7:2:1 (II).

Таблица 8.6. Характеристики тонкослойной хроматографии некоторых синтетических опиатов на пластинках «Силикагель G» (фирма «Мерк», Германия)

Алкалоид	R_f	
	I	II
Героин	0,63	0,65
6 – Ацетилморфин	0,46	0,46
Ацетилкодеин	0,63	0,69

В этих условиях удастся идентифицировать, например, 6-ацетилморфин – продукт гидролиза героина, часто присутствующий в образцах конфискованного героина. Другим продуктом гидролиза может быть 3-ацетилморфин. Для разделения этих двух изомеров используют пластинки «Силикагель 60 F₂₅₄» и подвижную фазу: толуол–ацетон–этанол–25%-ный раствор аммиака, 45:45:7:3 [101]. При этом величина R_f 3-ацетилморфина составляет 0,55, а 6-ацетилморфина – 0,48.

В работе [102] были предложены три системы растворителей для разделения смеси морфина и его полусинтетических производных на пластинках «Силикагель 60 F₂₅₄» на стеклянной подложке: хлороформ–метанол–вода, 7:5:1 (I); этилацетат–метанол–25%-ный

Таблица 8.7. ТСХ-харак...

Для выявления некотор...

Пластинки «Сорбтон»...

Другой модификаци...

8.8. Каннабино...

В криминалистиче...

Для выявления к...

аммиак, 18:2:1 (II); трет-бутанол-метанол-25%-ный аммиак-вода, 20:4:1:2 (III), обнаружение пятен при облучении УФ-светом. Некоторые данные об удерживании алкалоидов в этих системах приведены в табл. 8.7.

Таблица 8.7. ТСХ-характеристики производных морфина на пластинках «Силикагель 60 F₂₅₄»

Алкалоид	R_f		
	I	II	III
Морфин	0,37	0,12	0,46
Этилморфин (дионин)	0,67	0,17	0,77
Кодеин	0,62	0,18	0,66

Для выявления некоторых наркотических анальгетиков, включая опиаты, может применяться подвижная фаза этанол-вода-25%-ный аммиак, 6:4:6. Величины R_f некоторых наркотических анальгетиков на пластинках «Сорбтон RP2» составляют: морфин – 0,80; кодеин – 0,62; папаверин – 0,53; дионин – 0,50; тебаин – 0,43; наркотин – 0,33; промедол – 0,27; эстоцин – 0,15. Для обнаружения пятен используют реактив Марки.

Пластинки «Сорбтон» представляют собой модифицированные пластинки «Сорбфил» с привитой неподвижной фазой C_2 . Эти пластинки могут быть использованы при исследовании биологических жидкостей (моча) пациентов, употреблявших, помимо опиатов, такие наркотики, как амфетамины и усиливающий наркотическое действие димедрол.

Другой модификацией пластинок «Сорбфил» являются пластинки «Сорбтон RP₈», в которых адсорбентом служит силикагель с привитой фазой C_8 . На таких пластинках оказывается возможным разделить компоненты омнопона (морфин, наркотин, папаверин, кодеин, тебаин) [103,104].

8.8. Каннабиноиды

В криминалистической и судебно-медицинской практике в качестве объектов встречаются различные части растений конопли (соцветия – метелки, мякина, листья), продукты переработки (гашиш, гашишное масло, марихуана), смывы с пальцев рук, полости рта и т.п. При тонкослойной хроматографии получаемых растворов идентификацию конопли и продуктов ее переработки осуществляют по наличию каннабиноидов: Δ^9 –тетрагидроканнабинола (Δ^9 -ТГК), его Δ^8 -изомера, каннабидиола, каннабинола и др.

Для выявления каннабиноидов тонкослойной хроматографией рекомендованы пластинки типа «Сорбфил» и «ВЭТСХ» и подвижная фаза петролейный эфир-диэтиловый эфир (9:1). Обнаружение пятен осуществляют: в УФ-свете (на пластинках с флуоресцирующим индикатором), а также опрыскиванием щелочным раствором красителя Прочного Синего Б (или ББ). При наличии каннабиноидов пятна окрашиваются в красно-оранжевый цвет. На пластинках «ВЭТСХ» с применением указанной выше подвижной фазы были получены следующие значения R_f для основных компонентов гашиша: Δ^8 -ТГК – 0,72; Δ^9 -ТГК – 0,60; каннабидиол – 0,56; каннабинол – 0,50.

В работе [104] идентификацию индийской конопли, гашиша и марихуаны проводили, используя ТСХ высокого давления на высокоэффективных силикагелевых пластинках с подвижной фазой бензол – *n*-гексан (3 : 1) с длиной пробега фронта 6 см, достигаемой за 6 мин. Пятна каннабиноидов обнаруживали обработкой растворами красителя Прочного Синего Б и водного аммиака.

8.9. Алкалоиды спорыньи

Спорынья *Claviceps purpurea*, гриб, паразитирующий на злаковых растениях, является источником эргоалкалоидов, применяемых в качестве лекарственных средств. В то же время алкалоиды спорыньи представляют собой производные лизергиновой и изолизергиновой кислот, обладающие сильным галлюциногенным действием. Одним из них является ЛСД – диэтиламид лизергиновой кислоты, запрещенный к применению.

Опубликовано большое число работ по тонкослойной хроматографии соединений этой группы. Эти вещества могут быть обнаружены на хроматограммах по голубой флуоресценции в УФ-свете; предел обнаружения около 0,05 мкг [106]. Кроме того, для обнаружения эргоалкалоидов применяют реактив Ван-Урка (*n*-диметиламинобензальдегид в кислой среде), с которым эргоалкалоиды образуют пятна синего цвета [18,101]. Тонкослойную хроматографию эргоалкалоидов можно осуществить на пластинах «Силикагель G» (фирма «Мерк», Германия) в подвижных фазах следующего состава: хлороформ–метанол, 4:1 (I); хлороформ–диэтиламин, 9:1 (II); хлороформ–метанол–25%-ный аммиак, 40:10:0,1 (III).

Таблица 8.8. Тонкослойная хроматография алкалоидов спорыньи на «Силикагеле G»

Алкалоид	R_f		
	S1	S2	S3
Эргометрин	27	2	40
Эрготамин	65	9	75
α -Эргокриптин	74	38	88
α -Эргокриптин	81	57	90
Эргометринин	39	20	66
Эргокристин	75	37	87

Описаны примеры разделения дигидроалкалоидов на слоях силикагеля, предварительно импрегированных смесями формамида, этанола и аммиака. При этом подвижными фазами служат смеси диизопропилового эфира, толуола, этанола и диэтиламина [105]. Для полуколичественного определения эргоалкалоидов (α и β -эргокриптинов и родственных соединений) в лекарственном препарате Абергин, могут применяться тонкослойные пластинки «Сорбфил». Для разделения этих эргоалкалоидов в качестве подвижной фазы предложена смесь дихлорметана с диоксаном и петролейным эфиром с добавкой 25%-ного аммиака (30:6:4:0,6). Предельно обнаруживаемое количество эргоалкалоидов в УФ-свете при 360 нм составляет 0,8 мкг. Хроматограммы предварительно обрабатывают 4%-ным раствором хлорамина Б при нагревании (120° С, 15 мин) [106, 107].

8.10. Алкалоиды из листьев коки (*Erythroxylum coca* Lam.)

Растительные материалы и экстракты листьев куста коки являются достаточно сложными объектами тонкослойной хроматографии. Разделение метаболитов кокаина, его аналогов и продуктов гидролиза представляет достаточно трудную задачу. Для этой цели могут быть использованы пластинки «Силикагель G» (фирма «Мерк», Германия) или «Гельман ITLCgel» (фирма «Гельман», Германия) и следующие системы растворителей:

Метанол–диэтиламин, 95 : 5 (I);

Этилацетат–метанол–аммиак (25%), 17:2:1 (II);

Хлороформ–ацетон–диэтиламин, 5:4:1 (III);

n-Бутанол–уксусная кислота–вода, 35:3:10 (IV).

Полученные в этих системах величины R_f для наиболее важных алкалоидов коки и их метаболитов приведены в табл. 8.9 [96]. Обнаружение пятен осуществляли с помощью реактива Драгендорфа (красно-оранжевое окрашивание) и раствора иодоплатината калия, дающего окраску пятен от пурпурной до синей.

Таблица 8.9. Хроматографические характеристики ($100R_f$) алкалоидов коки и их метаболитов в системах растворителей I–IV

Алкалоид	I	II	III	IV
Кокаин	76	98	98	83
Экгонин	62	И	33	48
Бензоилэкгонин	50	50	29	83
Тропакокаин	68	–	–	–
Метилэкгонин	–	98	98	66
Бензоилнорэкгонин	–	30	12	95
Норэкгонин	–	4	12	75

8.11. Грибы, содержащие псилоцин и/или псилоцибин

Алкалоиды группы индола из гриба *Psilocybe mexicana*, обладающие выраженным галлюциногенным действием, относятся к опасным сильнодействующим веществам [108]. К ним относятся алкалоиды псилоцин и псилоцибин. Эти алкалоиды найдены также и в других грибах, в том числе в *Panaeolina conocybe* [108–111].

Эти алкалоиды могут быть разделены на стандартных силикагелевых пластинках, например, «Силикагель 60» (фирма «Мерк», Германия) или «Силикагель» (фирма «Машерай-Нагель», Германия) при использовании подвижных фаз кислотного характера (метанол–ледяная уксусная кислота–вода, 15 : 2 : 3 (I) или *n*-бутанол–ледяная уксусная кислота–вода, 12 : 3 : 5 (II)). Величины R_f псилоцина и псилоцибина в этих системах растворителей равны, соответственно, 0,46 и 0,28 в системе I и 0,55 и 0,40 в системе II [96]. Пятна обнаруживают с помощью реактива Ван-Урка, дающего окраску от пурпурной до синей.

8.12. Тонкослойная хроматография наркотических и других сильнодействующих веществ медицинского назначения, изготовленных незаконно

Большую группу наркотических и сильнодействующих веществ, находящихся под международным контролем, составляют синтетические анальгетики (опиаты, промедол, просидол, метадон и некоторые другие), стимуляторы центральной нервной системы (фенамин, метамфетамин и другие амфетамины), транквилизаторы (в основном бензодиазепины), снотворные средства (барбитураты, производные 1,4-бензодиазеина, метаквалон).

В количественном отношении изымаемые из незаконного оборота на территории России наркотические средства – производные фенилэтиламина и амфетамина – занимают третье место после наркотических средств растительного происхождения, получаемых из конопли и мака [95, 110, 111].

Фенилалкиламины являются стимуляторами ЦНС, симпатомиметиками. Некоторые из них используются в спорте в виде запрещенных допинговых средств и психомоторных стимуляторов (амфетамин (фенамин), метамфетамин, а также эфедрон). Ряд препаратов этой группы находит применение в медицине. Для анализа смесей фенилалкиламинов методом тонкослойной хроматографии используют пластинки «Сорбфил» и систему растворителей бензол–этанол–диэтиламин (9:1:1). Величины R_f при этом равны: эфедрон – 0,65; первитин – 0,42. Несколько лучшее разделение первитина и эфедрина достигается на пластинках «ВЭТСХ» (Эстония) в следующей подвижной фазе: этилацетат–этанол–25%-ный аммиак, 18:2:1. При этом эфедрин имеет R_f – 0,50, первитин – 0,54 и эфедрон – 0,80.

В последнее время в связи с массовым импортом зарубежных лекарственных средств, содержащих псевдоэфедрин, возникла необходимость быстрой и простой предварительной идентификации эфедрина и псевдоэфедрина. Разделение этих соединений осуществляется на пластинках «Силуфол», «Сорбфил», «ВЭТСХ» в подвижной фазе: хлороформ–метанол–ацетон–25%-ный аммиак (40:20:6:3) [112].

Для обнаружения пятен используют раствор нингидрина (фиолетовая окраска) или красителя Бромкрезолового зеленого (синяя окраска на зеленом фоне). В приведенных условиях величина R_f эфедрина равна 0,55, псевдоэфедрин – 0,97.

8.13. Барбитураты

Довольно большую группу лекарственных средств успокаивающего действия составляют производные барбитуровой кислоты. Эти соединения включаются во многие распространенные лекарства (пенталгин, седалгин и т.п.), оказывающие снотворное и одновременно анальгезирующее действие [99].

Вместе с тем прием барбитуратов вызывает пристрастие к ним, особенно в сочетании с некоторыми наркотическими анальгетиками (кодеин). В настоящее время 14 производных барбитуровой кислоты находятся под международным контролем.

В токсикологическом анализе в последнее время стали применяться пластинки «Сорбфил» и «ВЭТСХ» для разделения и идентификации целого ряда барбитуратов. Для этих пластинок предлагается подвижная фаза: хлороформ–изопропанол–25%-ный аммиак (9:9:1). Данные о R_f при разделении барбитуратов, наиболее часто встречающихся в практике, приведены в табл. 8.10.

Таблица 8.10. Характеристики наиболее часто встречающихся производных барбитуровой кислоты

Барбитурат	R_f	
	Пластинки «Сорбфил»	Пластинки «ВЭТСХ»
Барбитал	0,52	0,75
Фенобарбитал	0,39	0,30
Этаминал натрия	0,80	0,65
Барбамил	0,75	0,60
Бутабарбитал	0,65	0,55

Для обнаружения пятен барбитуратов на хроматограммах чаще всего используют 1%-ный раствор нитрата одновалентной ртути, либо смесь 0,2%-ного спиртового раствора дифенилкарбазона и 2%-ного спиртового раствора хлорида ртути(II) (сулемы) [113, 114], а также 0,2%-ный спиртовой раствор флуоресцеина с последующим просматриванием в УФ-свете.

При использовании пластинок «Силуфол UV-254» для разделения барбамила, барбитала и фенобарбитала рекомендуют применять следующую подвижную фазу: бензол-диоксан-25 %-ный аммиак (12:7:1) [107].

Тонкослойную хроматографию высокого давления с применением прибора «Хром-пресс-25» для разделения ряда производных барбитуровой кислоты, находящихся под международным контролем, на пластинках «Силикагель 60 F₂₅₄» в режиме обращенно-фазовой хроматографии применяли в работах [125, 126]. Пластинки импрегнировали метанольными растворами бромидо додецилтриметиламмония (ДМТА) или хлорида трикаприлметиламмония (ТКМА), а также 10%-ным раствором парафина в *n*-гексане. В качестве подвижной фазы рекомендована смесь метанола и воды в соотношении 3:7 [115, 116].

Удовлетворительное разделение 16 барбитуратов было достигнуто с помощью двумерной тонкослойной хроматографии высокого давления в нормально-фазовом режиме на пластинках «Силикагель 60 F₂₅₄» (20 × 20 см). Для хроматографии в первом направлении использовали подвижную фазу следующего состава: этилацетат-этанол-*n*-гексан (1:1:38) под давлением 1 МПа (скорость потока 0,65 мл/мин), а во втором направлении применяли смесь пиридина и *n*-гексана (1:4) под давлением 2 МПа (скорость потока 1,3 мл/мин). Количественную оценку хроматограмм проводили на денситометре «Desaga CD-60» при 250 нм [117].

8.14. Производные 1,4-бензодиазепина

В эту группу лекарственных средств, оказывающих транквилизирующее действие, входит более 2000 фармакологически активных соединений. Бензодиазепины входят в состав более 100 отечественных и импортных лекарственных средств, которые находят применение в России. Большое число случаев злоупотребления бензодиазепинами послужило основанием Комиссии ООН по наркотикам отнести эту группу соединений к веществам, находящимся под международным контролем.

В зависимости от природы объекта, содержащего бензодиазепины, анализ методом тонкослойной хроматографии применяют в двух вариантах. Если объект представляет

собой лекарственное средство или кустарно изготовленный комбинированный препарат, содержащий какой-либо бензодиазепин в смеси с наркотиками, то используют высокоэффективные пластинки, например такие, как «Силикагель GF₂₅₄» (фирма «Мерк», Германия) и три системы растворителей, перечисленные ниже: гексан-метанол-ацетон, 15:3:1 (I); бензол-ацетон-этанол, 8:1:1 (II) и хлороформ-ацетон, 4:1. Обнаружение пятен бензодиазепинов осуществляют в УФ-свете, а также действием свежеприготовленного реактива Драгендорфа [113]. Результаты приведены в табл. 8.11.

Таблица 8.11. Хроматографические характеристики бензодиазепинов, метаквалона и героина на пластинках «Силикагель GF₂₅₄» [113]

Соединение	R_f		
	I	II	III
Диазепам	0,62	0,76	0,84
Нитразепам	0,44	0,56	0,64
Оксазепам	0,28	0,30	0,46
Метаквалон	0,70	0,81	0,87
Героин	0,30	0,22	0,19

При исследовании биологических жидкостей методом тонкослойной хроматографии обычно определяют продукты метаболизма и гидролиза бензодиазепинов. В табл. 8.12 представлены величины R_f продуктов гидролиза 1,4-бензодиазепинов (замещенных бензофенонов) на пластинках «Сорбфил» и «ВЭТСХ». Обнаружение пятен осуществляют по собственной окраске и по люминесценции в УФ-свете [95, 111].

Таблица 8.12. Результаты тонкослойной хроматографии бензофенонов в подвижной фазе бензол-этанол-диэтиламин, 19:1:0,4

Бензофенон	R_f	
	Пластинки «Сорбфил»	Пластинки «ВЭТСХ»
2-Амино-5-хлорбензофенон	0,52	0,75
2-Амино-5-нитробензофенон	0,39	0,30
2-Метиламино-5-хлорбензофенон	0,80	0,65

Для разделения производных 1,4-бензодиазепина применяли также тонкослойную хроматографию высокого давления в обращенно-фазовом режиме на силикагелевых пластинках, импрегнированных хлоридом трикаприлметиламмония в токе подвижных фаз типа водно-метанольных смесей [114-118]. В работе индийских авторов [119] предложен вариант тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинках для определения диазепама, нитразепама, медазепама и хлордiazепоксиды в системе растворителей *n*-гексан-ацетон (3:2). Для обнаружения пятен бензодиазепинов был предложен реактив: раствор хлорида олова (II) в соляной кислоте с последующим нагреванием при 100° С в течение 5 мин.

Изложенные данные показывают, что тонкослойная хроматография представляет собой достаточно мощный и высокопроизводительный метод выявления присутствия подлежащих контролю веществ в самых разнообразных объектах как природного, так и синтетического происхождения. Тем не менее все положительные результаты,

полученные этим методом, должны рассматриваться лишь как основание для анализа исследуемого объекта более совершенными специальными методами, такими как высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография и хромато-масс-спектрометрия.

Литература

1. Macek K., Hais T.M., Paper Chromatography, Amsterdam: Elsevier, 1962.
2. Stationary Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography, Macek K., Hais T.M., Eds., Amsterdam: Elsevier, 1965.
3. Thin-Layer Chromatography, Marini-Bettali G.B., Ed., Amsterdam: Elsevier, 1964.
4. Kirchner J.G., Thin-Layer Chromatography, New York: Wiley, vol. 1, 2, 1978; русский перевод: Тонкослойная хроматография, М.: Мир, 1981, т. 1, 2.
5. Тюкавкина Н.А., Литвиненко В.И., Шостаковский М.Ф. Хроматография на полиамидных сорбентах в органической химии, Новосибирск: Наука, 1973.
6. Ахрем А.А., Кузнецова А.И., Тонкослойная хроматография, М.: Химия, 1964.
7. Волюнец М.П., Тонкослойная хроматография в неорганическом анализе, М.: Наука, 1974.
8. Кибардин С.А., Макаров К.А., Тонкослойная хроматография в органической химии, М.: Химия, 1978.
9. Geiss F., Fundamentals of Thin-Layer Chromatography (Planar Chromatography), Heidelberg: Huthig Verlag, 1987; русский перевод: Основы тонкослойной хроматографии, т. 1, 2, М.: Инст. Физич. Химии РАН, 1999.
10. Geiss F., Die Parameter der Dunnschichtchromatographie, eine moderne Einfuhrung in Grundlagen und Praxis, Wiesbaden: Vieweg, 1972.
11. Consden R., Gordon A.H., Martin A.J., Biochem J., 1944, vol. 38, p. 225.
12. Измайлов Т.А., Шрайбер М.С., Фармация, 1938, № 3, с.1.
13. Шрайбер М.С., В кн.: Успехи хроматографии, к 100-летию со дня рождения основателя хроматографии М.С. Цвета, Чмутков К.В., Сакодинский К.И., ред., М.: Наука, 1972, с. 31-32.
14. Stahl E., Schroeter G., Kraft G., Renz R., Pharmazie, 1956, vol. 11, p. 633.
15. Kirchner J.G., Keller G.L, J. Am. Chem. Soc., 1950, vol. 72, p. 1867.
16. Thin-Layer Chromatography, Stahl E., Ed., New York: Academic Press, 1965; русский перевод: Тонкослойная хроматография М.: Мир, 1966.
17. Thin-Layer Chromatography, Touchstone S.C., Rogers D., Eds., New York: Wiley, 1981.
18. Šaršunova M., Schwarz V., Michalec Ć., Chromatografia na tonkich vrstvách vo farmácii a v klinickej biochémii, vols. 1,2, Prague: Osveta, 1977; русский перевод: Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии, ч. 1, 2, М.: Мир, 1980, с. 237.
19. Pataki G., Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie, Berlin: W. de Gruyter, 1966.
20. Волюнец М.П., Количественная тонкослойная хроматография в неорганическом анализе, М.: Наука, 1993.
21. Ranny M., Thin-Layer Chromatography with Flame Ionization Detection, Prague, Academia, 1987.
22. Hofmann A.E., Hydroxyapatite as an Adsorbent for Thin-Layer Chromatography. Separation of lipids and proteins. In: New Biochemical Separations, James A.T., Moms L.J., Eds., New York: Van Nostrand, 1964.
23. Bibliography of Paper and Thin-Layer Chromatography, 1961-1965, Macek K., Hais I.M., opecký J., Gasparič J., Eds., Amsterdam: Elsevier, 1968.

24. Bibliography of Paper and Thin-Layer Chromatography, 1966-1969, Macek K., Hais I.M., Kopecký J., Gasparič J., Rabek V., Churaček J., Eds., Amsterdam: Elsevier, 1972.
25. Bibliography of Paper and Thin-Layer Chromatography, 1970-1973, Macek K., Hais I.M., Kopecký J., Schwarz S., Gasparič J., Churaček J., Eds., Amsterdam: Elsevier, 1976.
26. HPTLC. High Performance Thin-Layer Chromatography, Zlatkis A., Kaiser R., Eds., Amsterdam: Elsevier, 1977; русский перевод: Высокоэффективная тонкослойная хроматография, М.: Мир, 1979.
27. Eisenbeiss F., BadDurkheim, 1973; Cit from [26], p. 15.
28. Halpaar H., J. Chromatogr., 1973, vol. 78, no. 1, p. 77.
29. Blome J., in [26], p. 47.
30. Janchen D., J. Chromatogr., 1964, vol. 14, p. 261.
31. Hesel IL, Angew. Chem., 1973, B.85, S. 334.
32. Okumura TT, Kadono T., J. chromatogr. 1973, vol. 86, p. 57.
33. Андреев Л.В., Татариунас Т., Карнаухов В.Н., Биофизика живой клетки, 1971, № 2, с. 84.
34. Rippahn J., Halpaar H., Use of modern high-performance adsorbents in the quantitative thin-layer Chromatography, in: HPTLC. High Performance Thin-Layer Chromatography, Zlatkis A., Kaiser R., Eds., Amsterdam: Elsevier, 1977; русский перевод: Высокоэффективная тонкослойная хроматография, М.: Мир, 1979, p. 217.
35. Klaus R., Rippahn J., J. Chromatogr., 1982, vol. 244, pp. 99-124.
36. Fessler J.N., Galley H., Nature, 1964, vol. 201, p. 1056.
37. Truter E.V., J. Chromatogr., 1964, vol. 14, p. 57.
38. Musgrave A., J. Chromatogr., 1969, vol. 41, p. 470.
39. Berezkin V.G., Markov A.B., J. Planar Chromatogr., 1999, vol. 12, pp. 279-283.
40. Darcy H., Les Fontaines publique de la Ville de Dijon, Paris: Dalmont, 1856.
41. Bell J.M., Cameron F.K., J. Phys. Chem., 1906, vol. 10, p. 658.
42. Reid R.C., Sherwood T.K., Properties of Gases and Liquids, New York: McGraw Hill, 1958.
43. Ruoff A.L., Giddings J.C., J. Chromatogr, 1960, vol. 3, p. 438.
44. Introduction to Microscale High-Performance Liquid Chromatography, Ishii D., Ed., New York: VCH Pubs., 1988; русский перевод: Введение в микромасштабную высокоэффективную жидкостную хроматографию, М.: Мир, 1991.
45. Freimuth U., Keibel D., Buchner M., Akta med. Germ., 1966, vol. 17, p. 241.
46. Guiochon G., Siouffi A., J. Chromatogr. Sci., 1978, vol. 16, p. 598.
47. Bryant L.H., Nature, 1955, vol. 175, p. 556.
48. Кныр Л.Л., Соколов М.С., Перфилова Н.В., Андреев Л.В., В сб.: Поведение, превращение и анализ пестицидов и их метаболитов в почве, Пушино на Оке: Наука, 1973, с. 152.
49. Kalasz H., Nagy J., Proc. V Danube Sympos. on Chromatography, Yalta, 1985, Moscow: Nauka, 1985, p. 187.
50. Tyihak E., Kalasz H., Mincsovcics E., Nagy J., Proc XVII Hung. Ann. Meet. Biochem., Keskemet, 1977, vol 17, p. 183.
51. Lengyel Z., Tyihak E., Mincsovcics E., J. Liquid Chromatogr., 1982.
52. Tyihak E., Mincsovcics E., Kalasz H., J. Chromatogr., 1979, vol. 174, p. 75.
53. Mincsovcics E., Kalasz H., Tyihak E., J. Chromatogr., 1980, vol. 191, p. 293.
54. Tyihak E., Mincsovcics E., Kalasz H., J. Chromatogr., 1981, vol. 211, p. 45.
55. Dudas K., Szepesi G., Pap A., Feher T., Mincsovcics E., Tyihak E., Anal. Chem., Sympos. Ser., 1982, vol. 10, p. 417.

56. Chrompress-10. Overpressurized Thin-Layer Chromatography, Labor-MIM, Budapest, 1982.
57. Ngo-Tuan-Cong, Tyihak E., Vaida M., Mincsovcics E., J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 1982, vol. 5, p. 511.
58. Fater Z., Kemeny G., Mincsovcics E., Dev. Food Sci., 1983, vol. 5A, p. 483.
59. Abralam M., Polyak B., Szajani B., Boross L., J. Liquid chromatogr., 1983, vol. 6, p. 2635.
60. Gulyas H., J. Chromatogr., 1985, vol. 319, p. 105.
61. Gulyas H., Kemeny G., Hollosi J., Pucsok J., J. Chromatogr., 1984, vol. 291, p. 471.
62. Mincsovcics E., Tyihak E., Kalasz H. J. Chromatogr., 1980, vol. 191, p. 293.
63. Tyihak E., Mincsovcics E., Tetengi P., Zambo J., Kalasz H., Herba Hung., 1980, vol. 19, no. 1, p. 113.
64. Hauck H.F., Jost W., J. Chromatogr., 1983, vol. 262, p. 113.
65. Лейстнер Л., Салма Э., Кузьмин Н. М., Ж. анал. хим. 1982, т. 37, с. 1384.
66. Szepesi G., Vegh Z., Gyulay Z., Gazdag M., J. Chromatogr., 1984, vol. 290, p. 127.
67. Gazdag M., Szepesi G., Hernyes M., Vegh Z., J. Chromatogr., 1984, vol. 290, p. 135.
68. Janos E., Cserhati T., Tyihaa E., J. High Resolut. Chromatogr., Chromatogr. Commun., 1982, vol. 5, p. 634.
69. Newman J. M., Intern. Lab., 1985, vol. 15, no. 5, p. 22.
70. Newman J. M., Amer. Lab., 1985, vol. 17, no. 4, p. 52.
71. Kalas H., Nagy J., J. Liquid Chromatogr., 1981, vol. 4, p. 985.
72. Newman J. M., Lab. Pract., 1985, vol. 34, no. 1, p. 65.
73. Vajda J., Leistner L., Pick J., Ann-Tuan N., Chromatographia, 1986, vol. 21, p. 152.
74. Bardosz S., Kursai T., Elodi P., Chromatographia, 1985, vol. 20, p. 23.
75. Varadi M., Harsahyi G., Hungar. Sci. Instrum., 1985, vol. 59, p. 1.
76. Kery A., Turiak G., Verzas-Petri G., Proc. V Danube Sympos on Chromatography, Yalta, 1985, Moscow: Nauka, 1985, p. 188.
77. Tyihak E., Proc. V Danube Sympos on Chromatography, Yalta, 1985, Moscow: Nauka, 1985, p. 5.
78. Березкин В. Г., Бурзаев В. В., Успехи химии, 1987, т. 61, вып. 4, с. 632.
79. Vaguifalvi D., PlantaMed/. 1960, vol. 8, p. 34.
80. Lisboa B. P., J. Chromatogr., 1964, vol. 13, p. 513.
81. Munier R., Bull. Soc. Chira. BioL 1953, vol. 35, p. 1225.
82. Ерёмин С.К., Изотов Б.И., Веселовская Н.В., Анализ наркотических средств, М.: Мысль, 1993, 271 с.
83. Peker J., Geger R., Eppert G., J. Chromatogr, 1973, vol. 78, pp.
84. Emons H. H., Keune H., Seyfarth H. H., Chemische Mikroskopie. Eine Einfiihrung in Chemische mikroskopischer Untersuchungsmethoden, Leipzig: Deutscher Verlag Grundstoffindustrie, 1973.
85. Цыганов Н. Н., Основы цветной фотографии и аэрофотографии, М.: Геодезиздат, 1956, 176 с.
86. Корчагин В.П., Нефедов В.Л., Островский Э.Я. и др., Аэрофизические методы поисков месторождений редких элементов, М.: Госгеолтехиздат, 1963.
87. Yu-Chie Chen, Jentaie Shiea, Jan Sunner, J. Chromatogr. A, 1998, vol. 826, pp. 77-86.
88. Orinak A., Orinakova R., Turcaniova L., J. Chromatogr. A, 1998, vol. 825, no. 2, pp. 189-194.
89. Sarbu C., Todor S., J. Chromatogr. A, 1998, vol. 822, pp. 263-269.
90. Modern Practice of Liquid Chromatigraphy, Kirkland J. J., Ed., New York: Wiley Interscience, 1971; русский перевод: Современное состояние жидкостной хроматографии, М.: Мир, 1974.

91. Perry S. G., Amos R., Brewer P. I., Practical Liquid Chromatography, New York: Plenum Press, 1972; русский перевод: Практическое руководство по жидкостной хроматографии, М.: Мир, 1974.
92. Schoenmakers P. J., Optimization of Chromatographic Selectivity, Amsterdam Elsevier, 1986; русский перевод: Оптимизация селективности в хроматографии, М.: Мир, 1989.
93. Стыскин Е. Л., Ициксон Л. Б., Брауде Е. В., Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография, М.: Химия, 1986.
94. Симонов Е. А., Изотов Б. Н., Фесенко А. В., Наркотики. Методы анализа на коже, в ее придатках и выделениях, М.: Анахарсис, 2000, 128 с.
95. Svendsen A. B., J. Planar Chromatogr. 1989, vol. 2, p. 8-18.
96. Stahl E., Jork H., Dumont E., et al., Arzneim. - Forsch., 1969, vol. 2, pp. 194-199.
97. Гаевский А. В., Савенко В. Т., Семкин Е. Л. и др., Криминалистическое исследование опийного и масличного маков., МВД РФ. М. 1991, с. 3-30.
98. De Zeeuw R. A., Witte D. T., Franke J. P. // J. Chromatogr. 1990, vol. 500, p. 661-667.
99. Kaess A., Matins C. // Ann. Pharm. Fratiq., 1965, vol. 23, p. 739.
100. Stahl E. and Bromberg J. // Dtsch. Apoth. Ztg., 1978, B. 118, s. 15.
101. Kalasz H., Kerecsen L., Csermely T. // J. Planar Chromatogr., 1995, vol. 8, pp. 17-22.
102. Сорокин В. И., Гаевский А. В., Дегтерев Е. В., Волков С. К. // В кн. «Использование экспресс-тестов при исследовании наркотических и сильнодействующих веществ», МВД РФ, М., 1997, с. 34-43.
103. Witkiewicz Z., Mazurek M., Bladek J. // J. Planar Chromatogr., 1993, vol. 6, p. 407.
104. Волошина Д. А., Шаин С. С., Хим.-фарм. журн. // 17(2), 1983, т. 17, N 2, p. 138.
105. Абергин, ВФС 42-2244-93.
106. Таблетки Абергина, ВФС 42-2245-93.
107. Hofmann A., Heim R., Brack A., Kobel H. // Experientia, 1958, vol. 1, pp. 107.
108. Christiansen A. L., Rasmussen K. E., Tonnesen F. // J. Chromatogr., 1981, vol. 210, p. 163.
109. Christiansen A. L., Tonnesen F., Rasmussen K. E. // Planta Med., 1984, vol. 3, p. 341.
110. Дегтярев Е. В. В сб.: 100 лет хроматографии, М.: Наука, 2003.
111. Лыкова Р. В. // Хим.-фарм. журн., 1987, т. 21, N 4, с. 446.
112. Kamble V. W., Garad M. V., Padalikar S. V. // J. Planar Chromatogr., 1995, vol. 8, p. 143-144.
113. Poludek-Fabini R., Beirich Th., Organische Analyse, Leipzig: Akademieverlag, 1975; русский перевод: Полудек-Фабини Р., Бейрих Т. // Органический анализ, Ленинград: Химия, 1981, 622 с.
114. Kovacs-Hadady K. // J. Chromatogr., 589. p. 301-306, 1992.
115. Kovacs-Hadady K. // J. Chromatogr., 8, p. 47-51, 1995.
116. Fater Z., Szabady B., Nyiredy S. // J. Planar Chromatogr., 8, p. 145-146, 1995.
117. Kovacs-Hadady K. // J. Pharm. Biomed. Anal. Chromatogr., 10, p. 1025-1032, 1992.
118. Patie V. B., Shingare M. S. // J. Planar Chromatogr., 6, p. 497-498, 1993.
119. Fater Z., Szabady B., Nyiredy S. // J. Planar Chromatogr., 8, p. 145-146, 1995.
120. Kovacs-Hadady K. // J. Pharm. Biomed. Anal. Chromatogr., 10, p. 1025-1032, 1992.
121. Patie V. B., Shingare M. S. // J. Planar Chromatogr., 6, p. 497-498, 1993.

ГЛАВА 9

ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НАРКОТИКОВ И ДОПИНГОВЫХ СРЕДСТВ. ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАРКОТИКОВ И ДОПИНГОВЫХ СРЕДСТВ

9.1. Введение

Кроме жидкостей, текучими средами, способными переносить разделяемые вещества по хроматографической колонке, могут быть газы и пары летучих веществ в докритическом и в сверхкритическом состоянии (сверхкритические флюиды).

Большую группу процессов, в которых используются такие газообразные или парообразные подвижные фазы, относят к методам газовой хроматографии. Применение в этих процессах газообразных или парообразных веществ имеет ряд преимуществ, основные из которых суть следующие.

- Малая вязкость газов и паров позволяет применять хроматографические колонки очень большой длины по сравнению с колонками, используемыми в жидкостной хроматографии. Это позволяет достаточно просто достигать очень высокой эффективности разделения (до 100–200 тыс. теор. тарелок (т.т.) и более), что дает возможность анализировать пробы, содержащие до 200–300 различных компонентов.
- Большое различие в свойствах относительно низкомолекулярных газов и паров, с одной стороны, и разделяемых соединений, с другой стороны, обусловило развитием многочисленных и высокочувствительных методов детектирования в газовом потоке веществ, покидающих хроматографическую колонку. Это обеспечивает возможность выявления компонентов, присутствующих в анализируемой пробе в количестве порядка 1–10 пг (10^{-12} г).

Идея о возможности использования в хроматографии газообразных подвижных фаз была впервые высказана Мартином и Синджем в 1941 г. в их знаменитой работе, посвященной распределительной жидкостной хроматографии [1]. В тот же период времени были опубликованы эксперименты немецкого химика Хессе, осуществившего процесс разделения эфиров циклогексеновых кислот в газовой фазе [2]. Однако в период Второй мировой войны эти работы не получили развития. Только после 1946–1950 гг. были осуществлены процессы хроматографического разделения постоянных газов и легких углеводородов на колонках, заполненных активными адсорбентами (оксидом алюминия, силикагелем и др.) [3–6]. Этот вариант обсуждаемого метода был назван газовой

адсорбционной хроматографией. В связи с тем, что адсорбционная способность веществ быстро возрастает при увеличении их молекулярной массы, метод газо-адсорбционной хроматографии нашел применение, главным образом, при анализе и разделении относительно низкомолекулярных веществ, таких как постоянные газы, низшие углеводороды, газообразные анестетики и т.п.

Значительно более универсальным оказался описанный в 1952 г. Мартином и Джеймсом метод газо-жидкостной хроматографии [7].

В этом методе, вначале называвшемся методом газовой распределительной хроматографии, неподвижной фазой служит нелетучая жидкость, в форме тонкой пленки нанесенная на какой-либо инертный твердый носитель или на стенки тонкого (диаметром 0,1–0,5 мм) капилляра достаточно большой длины (от 5–10 до 500 м и более).

Прямолинейность изотерм сорбции, свойственная процессу распределения веществ между газообразной и жидкой фазами, обуславливает симметричность хроматографических зон, что облегчает разделение близких по свойствам соединений. С другой стороны, возможность в широчайших пределах изменять свойства неподвижных фаз, применяя самые разнообразные жидкости, создает большие возможности для выбора сорбционной системы, наиболее подходящей для разделения данной группы соединений.

Эти обстоятельства делают возможным применение газовой хроматографии для разделения смесей исключительно близких по свойствам веществ (изомеров, изотопнозамещенных соединений и др.). В настоящее время метод газо-жидкостной хроматографии применяется для анализа и разделения очень широкого круга веществ от легких газов до высокомолекулярных компонентов нефтяных топлив, триглицеридов жирных кислот, летучих производных многих металлов и т.п. [8, 9].

В химико-токсикологическом анализе метод газо-жидкостной хроматографии применяют для обнаружения и количественного определения разнообразных лекарственных средств, токсичных технических продуктов, наркотических и допинговых веществ, как в чистых субстанциях и фармацевтических препаратах, так и в биологических пробах. Особенно действенным для этой цели оказываются комбинированные методы, включающие газовую хроматографию и масс-спектрометрию (метод хромато-масс-спектрометрии) или газовую хроматографию в сочетании с ИК-Фурье-спектроскопией [10–12].

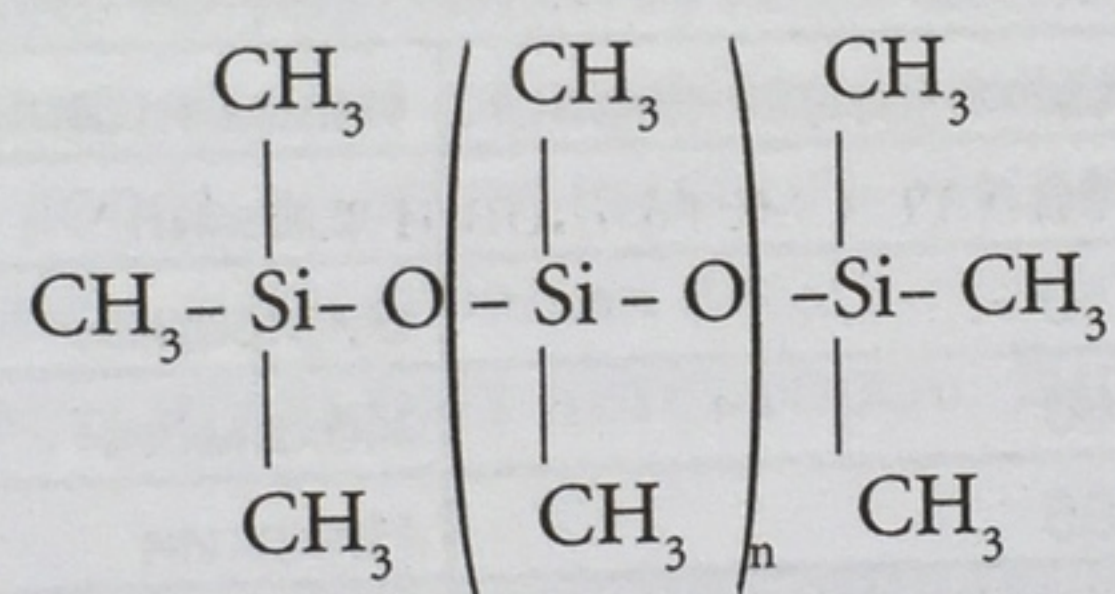
9.2. Техника выполнения анализов

Анализы с помощью метода газовой хроматографии осуществляются с применением достаточно совершенных приборов – газовых хроматографов [13]. Общая схема такого прибора соответствует описанной в гл. 6, однако источником подвижной фазы вместо резервуара с растворителем служит баллон со сжатым газом или парогенератор. В некоторых случаях источником газообразной подвижной фазы может служить электролизер, генерирующий водород путем электролиза воды [14].

Колонку газового хроматографа помещают в термостат, позволяющий проводить анализы при любой температуре от комнатной или более низкой до 350–400° С и выше. Анализы наркотических и допинговых средств, включающих вещества с достаточно большой молекулярной массой, обычно проводят при температурах от 150 до 250–300° С. Техника газовой хроматографии подробно описана в ряде обстоятельных монографий и учебников [15–20].

Колонки для газовой хроматографии могут представлять собой металлические или стеклянные трубки длиной 0,2–5,0 м и более, заполненные инертными порошкообразными твердыми носителями с величиной зерен 0,1–0,5 мм, на которые наносят неподвижные жидкие фазы в количестве от 0,1 до 15–20% от массы носителя. В настоящее время большую часть газохроматографических анализов наркотических и допинговых средств выполняют с применением капиллярных колонок, представляющих собой тонкие трубки длиной 10–100 м и более и диаметром 0,1–0,5 мм, изготовленные из металлов, стекла, а в последние годы преимущественно из плавленого кварца. На внутреннюю поверхность этих трубок наносят равномерную тонкую пленку неподвижной фазы [21–22]. Приготовление капиллярных колонок представляет собой достаточно сложный и трудоемкий процесс [23]. Поэтому в настоящее время в химико-аналитических лабораториях, занимающихся контролем наркотических и допинговых средств, лишь в редких случаях готовят капиллярные колонки, предпочитая приобретать их готовыми у фирм-производителей, число которых достаточно велико.

В первые десятилетия развития газовой хроматографии были испытаны и рекомендованы для различных анализов весьма многочисленные и разнообразные по своей природе неподвижные фазы, общее число которых превысило 1000 наименований. Однако с развитием высокоэффективной капиллярной хроматографии число применяемых неподвижных фаз сильно сократилось. В настоящее время, в основном, используют силиконовые полимеры, чаще всего полидиметилсилоксаны, строение которых можно выразить следующей формулой:



Часть метильных групп может быть заменена на фенильные, цианопропильные или трифторпропильные группы, что придает неподвижным фазам специфические селективные свойства, в частности, увеличивая их полярность. При нанесении неподвижной фазы в нее добавляют небольшое количество сшивающего агента (перекись *трет.*-бутила и т.п.), что приводит к сшиванию отдельных полимерных цепей и делает неподвижную фазу нерастворимой в органических растворителях [24]. Одновременно резко уменьшает способность неподвижной фазы к испарению при повышенной температуре и уносу с потоком газообразной подвижной фазы. Важным преимуществом капиллярных колонок со сшитыми (иммобилизованными) неподвижными фазами является возможность без ухудшения их качества промывать их органическими растворителями (эфиром, хлористым метиленом и др.) при засорении нелетучими компонентами анализируемых проб.

Одной из самых распространенных неподвижных фаз в газовой хроматографии является полидиметилсилоксан, имеющий торговую марку SE-30. Близкие к этому полисилоксану полимеры в разное время были доступны под марками E-301, OV-1, OV-101 (OV – обозначение фирмы «Огайо Вэлли», США). Обычно эти полимеры, имеющие молекулярную массу от 100 до 500 тыс. а.е.м., представляют собой вязкие жидкости или студенистые почти бесцветные массы, легко растворимые в бензоле, хлороформе и хлористом метиле. Все эти полимеры обладают высокой термической устойчивостью и позволяют работать

при температуре колонок до 300–350° С. На пористые силикатные твердые носители эти полимеры наносят в количестве от 2 до 10% от массы носителя, а на стенки капиллярных колонок их наносят в виде тонких пленок, имеющих толщину от 0,25 до 1–1,5 мкм.

Опубликовано большое количество данных по параметрам удерживания различных лекарственных, наркотических и допинговых веществ на колонках с полисилоксановыми неподвижными фазами [25–30.]. В одной из наиболее обширных сводок такого рода приведены индексы удерживания 480 таких веществ на колонке с полидиметилсилоксаном SE-30 [30]. Эти данные, в основном, были получены на наполненных колонках длиной 1,5–2 м и диаметром 2–4 мм, заполненных высококачественными твердыми носителями (Хромосорб G, Хромосорб W-HP, Целит), промытыми кислотой и обработанными диметилхлорсиланом. На дезактивированные таким образом твердые носители наносили 2–3% полидиметилсилоксана SE-30 или E-301.

Индексы удерживания опорных веществ измеряли при следующих температурах: амфетамин (индекс удерживания 1150) 100° С; дифенилгидрамин (индекс удерживания 1877) 200° С; диметилхлорпромазин (индекс удерживания 2480) 230° С. Индексы удерживания прочих соединений пересчитывали со всей возможной тщательностью по данным о временах удерживания, приведенных в оригинальных работах. Ниже в табл. 9.1 приведены данные для некоторых лекарственных и наркотических веществ, взятые из списка работы [30].

Таблица 9.1. Газохроматографические индексы удерживания некоторых наркотических и лекарственных веществ на колонках с полидиметилсилоксановыми неподвижными фазами [30]

Наименование	Индекс удерживания	Наименование	Индекс удерживания
Амитриптилин	2200	Кетамин	1830
Кофеин	1810	Варфарин	1460
Кокаин	2180	Иохимбин	3290
Кодеин	2385	Никотин	1340
Котарнин	1780	Нитразепам	2675
Диазепам	2410	Оксазепам	2335
Диметилхлорпромазин	2480	Оксиморфон	2520
Дигидрокодеин	2365	Пахикарпин	1765
Дигидроэрготамин	2310	Пропранолол	2145
N,N-Диметиламфетамин	1230	N-Пропиламфетамин	1330
N,N-Диметифенитиламин	1150	Тебаин	2525
Метилендиоксиамфетамин (МДА)	1470	Теofilлин	1485
Мескалин	1690	Фентанил	2700
Метаквалон	2180	Фторпромазин	2175
Метилдиметокси-амфетамин	1620	Флуфеназин	3045
Метилэфедрин	1400	Фендиметразин	1440
Морфин	2435	Фенциклидин	1870
Галоперидол	2940	Эфедрин	1350
Гептабарбитон	2100	Эргокриптин	2180
Гиосциамин	2225	Эргокристин	2500
Ипрониазид	1580	Эрготамин	2360

9.2.1. Хроматографические колонки

Диапазон геометрических размеров и сорбционной емкости колонок, применяемых в настоящее время в газовой хроматографии, весьма широк. Так как параметры колонки в значительной степени определяют ряд конструктивных особенностей прибора равно как и характер решаемых задач, современная газовая хроматография разделяется на несколько методических вариантов, различающихся конструкцией и параметрами колонок.

Наиболее обычной является колоночная аналитическая газовая хроматография. Колонки, применяемые в этом варианте метода, обычно имеют внутренний диаметр 2–6 мм, длину от 15–20 см до 6 м и более и изготавливаются из стекла, металлов и пласт-масс. Колонка заполняется сорбентом – наполнителем, представляющим собой чаще всего инертный твердый носитель, покрытый тонкой пленкой неподвижной фазы, содержание которой составляет от 0,1 до 25–30% от массы носителя. Увеличение диаметра колонки до 30–50 мм и даже 100 мм и более характерно для препаративной хроматографии. Аппаратура этой модификации метода имеет устройства для сбора разделенных в колонке фракций. Производительность установок для препаративной хроматографии: колеблется от нескольких миллиграммов до сотен граммов вещества за один цикл.

Представление о наполненной колонке как о системе извилистых капилляров с внутренней поверхностью, покрытой пленкой неподвижной фазы, привело к созданию как пиллярных колонок, имеющих диаметр 0,03–0,5 мм (до 1 мм) и длину от нескольких метров до километра и более. Внутренние стенки капиллярных колонок покрывают пленкой неподвижной фазы, толщина которой составляет доли микрона. Это обуславливает чрезвычайно малую сорбционную емкость этих колонок, вынуждающую работать с весьма малыми пробами, регистрация компонентов которых возможна только с использованием высокочувствительных детекторов, типа пламенно-ионизационного (см. ниже).

Предложен вариант так называемой макрокапиллярной хроматографии, в которой используются колонки с внутренним диаметром более 0,5 мм («макрокапилляры»). Эти колонки обладают сорбционной емкостью в 10–100 раз большей, чем капилляры обычного диаметра, поэтому работа с ними значительно проще. Ниже будут коротко изложены особенности колонок каждого из перечисленных типов.

Наполненные аналитические колонки могут выполняться прямыми, U-образными или спиральными. Форма колонки зависит от материала, из которого она изготовлена, а также от размеров и конфигурации термостата хроматографа. При использовании стеклянных колонок довольно затруднительно обеспечить удобное и герметичное соединение колонок с испарителем, поэтому часто эти две детали объединяют в один узел. Следует отметить, что наполнение колонок сложной формы во избежание дробления твердого носителя должно проводиться после придания им нужной конфигурации.

Заполнение аналитических колонок сорбентом проводится таким образом, чтобы получить возможно более равномерную и плотную упаковку частиц наполнителя. При этом используются различные вибраторы [31, 32], вращающиеся трамбовки [33] и т.п. В ряде случаев для повышения равномерности набивки, особенно при заполнении колонок сложной конфигурации, вибрацию или удары сочетают с действием вакуума или, наоборот, избыточного давления [34].

Капиллярные колонки представляют собой трубки диаметром 0,03–0,5 мм, длиной от 2–3 до 1000 м и более, изготовленные из стекла, металлов или пластических масс, внутренняя поверхность которых покрыта равномерной пленкой неподвижной фазы.

В последние годы чаще всего используют капилляры, изготовленные из плавленого кварца. Процесс разделения веществ в капиллярных колонках отличается, в первую очередь, отсутствием размывания, обусловленного вихревой диффузией. Теория капиллярной хроматографии детально разработана в работах [25–37].

Подробный анализ имеющихся в литературе теоретических и экспериментальных данных, касающихся капиллярной хроматографии, проведен в книгах [22–24]. Основным результатом этого рассмотрения заключается в том, что наименьшая высота теоретической тарелки, которая может быть получена при помощи капиллярной колонки, близка к диаметру капилляров, так что разделяющая способность капиллярных колонок резко возрастает с уменьшением диаметра. Для веществ, отличающихся большим значением коэффициента Генри, т.е. имеющих большие объемы удерживания, эффективность мало зависит от толщины пленки неподвижной фазы, однако требования к равномерности толщины пленки, диаметра капилляра и однородности его внутренней поверхности весьма высоки. Выполнить эти требования можно только в том случае, если материал, из которого выполнен капилляр, обладает очень малой адсорбционной способностью, легко смачивается жидкостью, являющейся неподвижной фазой, позволяет получить капилляр достаточной длины с диаметром, равномерным по всей длине в пределах нескольких (2–3) процентов, отличается достаточной термической стойкостью и химической стабильностью при температуре разделения и не проявляет заметной каталитической активности.

Теория капиллярной хроматографии развита на основе предположения о том, что внутренняя поверхность капилляра является идеально гладкой, т.е. при диаметре 0,2–0,5 мм не имеет неровностей, больших 0,001 мм. Это предположение в общем оправдывается для стеклянных и пластмассовых капилляров. Металлические капилляры имеют обычно неровную поверхность, что хорошо видно на микрофотографиях. В работе [38] было показано, что высокие числа теоретических тарелок могут быть достигнуты с металлическими капиллярами при очень медленном нанесении пленки неподвижной жидкой фазы на внутреннюю поверхность капилляров.

В настоящее время капиллярные колонки выполняются из нержавеющей стали, меди и ее сплавов, алюминия, в редких случаях из серебра и золота [39]. В определенный период приобрели большое распространение колонки из стекла, однако в настоящее время колонки из всех этих материалов вытеснены колонками из плавленого кварца [40]. При использовании нейлоновых колонок длиной 1000 м были получены значения эффективности, превышающие 1 млн. т. т.

Для хорошей работы капиллярной колонки большое значение имеет способ образования пленки неподвижной фазы. В настоящее время эта операция осуществляется методом медленного продавливания через тщательно промытый и высушенный капилляр 5–15%-ного раствора жидкой фазы в неполярном растворителе при температуре на 2–3° С меньше его температуры кипения, либо путем испарения растворителя из 1–3%-ного раствора неподвижной фазы, целиком заполняющего капилляр. Объем порции раствора при продавливании составляет 1/2–1/3 объема используемого капилляра.

Техника приготовления капиллярных колонок подробно описана в книгах [22–24]. Малая величина проб, необходимая при использовании капиллярных колонок, предъявляет высокие требования к хроматографической аппаратуре. Помимо высокой чувствительности детектора, прибор должен быть выполнен таким образом, чтобы поверхность и объем дозатора, соединительных коммуникаций и детектора были минимальными. В противном случае происходит резкое искажение формы пиков и падение эффективности колонки из-за адсорбции веществ на поверхности деталей аппаратуры. Во всех газовых коммуникациях не должно быть непродуваемых газом полостей.

Перечисленные особенности приводят к тому, что осуществление процесса капиллярной хроматографии сопряжено с большими трудностями, чем проведение обычного варианта газовой хроматографии. Значительно проще осуществляется процесс разделения в случае так называемых макрокапиллярных колонок, имеющих диаметр в 3–4 раза больший, чем у капиллярных колонок (1–1,5 мм) при длине 50–150 м. Такие колонки подчиняются всем закономерностям, свойственным капиллярным колонкам, однако вследствие того, что их сечение в 10–15 раз превышает сечение малых капиллярных колонок, оказывается возможным во столько же раз увеличить объем пробы, что существенно снижает требования к чувствительности детектора и к качеству других элементов аппаратуры. Эти колонки могут применяться в сочетании с относительно менее чувствительными детекторами (по теплопроводности, плотности и т.п.) в аппаратуре для обычной газовой хроматографии. Вместе с тем макрокапиллярные колонки позволяют легко получить величины разделяющей способности порядка 10 000–15 000 т. т., что практически недостижимо при использовании наполненных колонок обычного диаметра.

Показано, что в зависимости от скорости газа-носителя макрокапиллярная колонка может работать в трех основных режимах. При сохранении линейной скорости газа на уровне, характерном для обычных наполненных колонок, макрокапиллярная колонка позволяет существенно сократить время анализа или при неизменном времени на 10–30°С снизить температуру колонки. Эффективность колонки в этом режиме составляет до 100–120 т.т/м [41].

Снижение скорости газа в 3–5 раз позволяет увеличить эффективность примерно вдвое – до 150–200 т. т./м, причем время анализа и температура колонки остаются на уровне, свойственном наполненным колонкам. Наконец, дальнейшее снижение скорости газа-носителя в 3–4 раза позволяет перевести колонку в режим «прецизионной» хроматографии. При этом эффективность увеличивается еще в 1,5–2 раза, но одновременно в несколько раз возрастает время анализа. Применение макрокапиллярных колонок позволяет получать эффективности разделения, превышающие 5000–6000 т. т. при использовании наиболее распространенных приборов с чувствительностью детектирующей системы 1000–2000 мВ. мл/мг при допустимой величине давления на входе в колонку 2–3 кг/см².

Важной особенностью газохроматографических анализаторов является применение разнообразных высокочувствительных детектирующих систем.

9.3. Принципы работы основных типов детектирующих систем в газовой хроматографии и методы расчета поправочных коэффициентов

Переход от хроматографических процентов к истинным (массовым или мольным) требует знания пересчетных, поправочных коэффициентов. Как было указано в гл. 6, такие коэффициенты могут быть определены методом абсолютной калибровки, однако трудоемкость этого способа побуждает искать другие пути для получения точной количественной информации. Одним из таких возможных путей являются поиски закономерностей, связывающих сигнал детектора какого-либо определенного типа и физико-химические свойства детектируемых соединений. Здесь мы ограничимся рассмотрением методов расчета коэффициентов, переводящих величины хроматографических процентов в весовые (массовые) или мольные концентрации, т. е. компенсирующих различия в величине сигнала детектора, определяемые принципом работы последнего и индивидуальной природой детектируемых веществ. В настоящее время наиболее часто применяют следующие дифференциальные детекторы.

9.3.1. Детектор по теплопроводности

Принцип действия детектора по теплопроводности, или, как его часто называют, катарометра, основан на том, что теплоотдача с поверхности проволоки, нагреваемой электрическим током, в основном определяется теплопроводностью окружающей среды. Теплопроводность парогазовых смесей является функцией состава, поэтому появление выходящего из колонки компонента вызывает изменение температуры проволоки, находящейся в потоке газа-носителя. С изменением температуры меняется сопротивление, а несложная мостиковая схема преобразует это изменение в электрический сигнал, пропорциональный концентрации вещества в газе-носителе [42].

Не останавливаясь подробно на анализе работы электрической схемы, укажем только, что сигнал детектора по теплопроводности связан с основными его рабочими параметрами следующей формулой:

$$E = \alpha R_0 \frac{\Delta\lambda}{\lambda} \times \frac{i^3}{2} \quad (9.1)$$

где R_0 – сопротивление проволоки при 0°C ; α – температурный коэффициент сопротивления; $\Delta\lambda$ – изменение теплопроводности смеси; λ – теплопроводность газа-носителя; i – ток накала. Из этой формулы видно, что чувствительность катарометра тем больше, чем больше разница в теплопроводностях газа-носителя и регистрируемого компонента, чем выше температурный коэффициент сопротивления материала проволоки и чем больше сопротивление проволоки.

При прочих равных условиях чувствительность катарометра растет пропорционально третьей степени тока накала. Очень выгодным, с точки зрения повышения чувствительности, является применение в качестве рабочих элементов катарометров термисторов, так как величины R_0 и α у них на несколько порядков больше, чем у нагретых металлических проволок. Однако малая температурная устойчивость ограничивает их распространение.

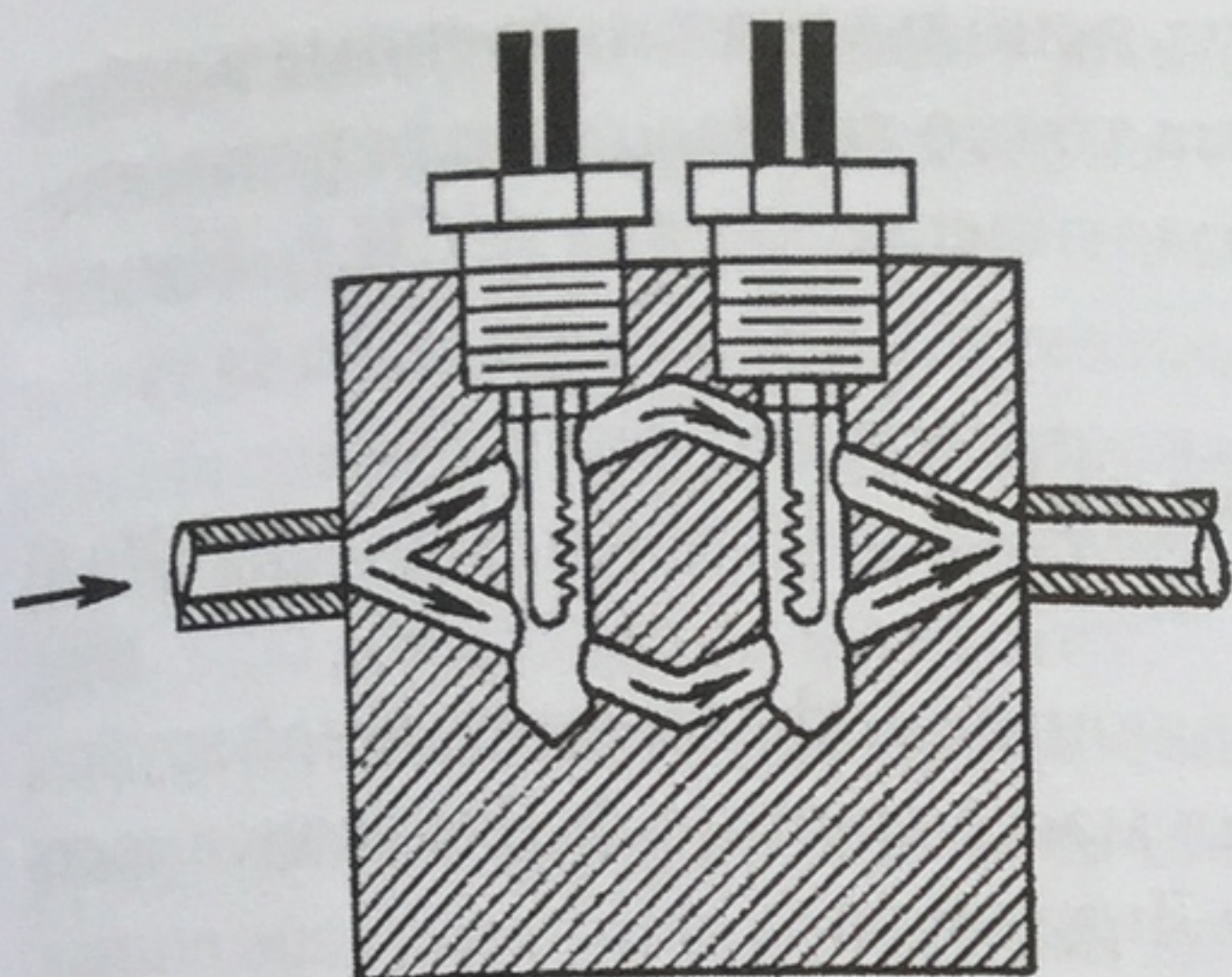


Рис. 9.1. Конструкция детектора по теплопроводности (катарометра) полудиффузного типа

Детекторы по теплопроводности конструируются так, чтобы изменения скорости газа-носителя оказывали возможно меньшее влияние на результирующий сигнал. Одна из наиболее удачных конструкций показана на рис. 9.1.

Большое число теоретических и экспериментальных работ, связанных с определением поправочных коэффициентов, выполнено применительно именно к этому типу детекторов. В ряде работ, часть из которых обсуждается далее, было показано, что площадь пика, записанного при помощи катарометра, обычно не соответствует точно ни мольному, ни массовому содержанию компонента. Попытка использовать в качестве мольных поправочных коэффициентов величины, обратные теплопроводностям компонентов смеси, не увенчалась успехом [43]. Более удачным оказалось предложение Фейша и Энгельгарта [44], считавших, что при использовании в качестве подвижных фаз легких газов с большой теплопроводностью (водород, гелий) площади под кривой пропорциональны произведению $gM^{3/4}$, где g – количество вещества в молях, а M – его молекулярная масса. В то же время отношения молекулярных масс в степени $4/3$ оказались удачными поправочными коэффициентами, переводящими хроматографические проценты в массовые. Определенные таким образом коэффициенты оказались близкими к величинам, экспериментально определенным для углеводородов [45]. В тщательно выполненных работах [46, 47] было показано, что для одного гомологического ряда имеет место зависимость:

$$\frac{1}{K_m} = A + BM \quad (9.1)$$

где коэффициенты A и B для одного ряда постоянны. Из экспериментальных данных были найдены эти коэффициенты для большого числа рядов. При этом оказалось, что коэффициент A для разных рядов различается в 5–7 раз, тогда как B остается приблизительно постоянным. При применении гелия и водорода коэффициенты A и B не зависят от концентрации компонентов в весьма широком интервале, от рабочей температуры, а также от типа и конструкции катарометра.

Применение в качестве газа-носителя азота делает расчет поправок почти невозможным.

Некоторые авторы пытались обосновать теоретически расчет поправок по значениям теплопроводностей компонентов [48] и по плотности их паров [49]. Наиболее удачными оказались результаты работы [50], в которой было показано, что теплопроводность смеси газа-носителя и примеси связана с ее концентрацией, теплопроводностями и средними диаметрами молекул газа-носителя и примеси. Считая средний диаметр молекул

равным сумме диаметров ее фрагментов, Литтлвуд использовал найденные в работе диаметры фрагментов для расчета поправок, весьма точно совпавших с определенными экспериментально. Показано [51], что для гомологического ряда $A(CH_2)_n-H$ имеет место соотношение

$$d_2 = d_A^2 + n d_{CH_2}^2 K(M_A + 14n) \quad (9.3)$$

где d, d_A, d_{CH_2} – средние диаметры молекулы и составляющих ее функциональной группы A и метиленовой группы CH_2 , а M_A – молекулярная масса группы A . Эта зависимость существенно облегчает расчет поправок по методу Литтлвуда.

В ряде случаев, особенно при применении азота, а также при высокой температуре нитей детектора наблюдается инверсия пиков, что, по-видимому, связано с изменением теплоемкости газовой смеси.

Таким образом, из изложенного ясно, что простого и точного способа определения поправок для детектора по теплопроводности пока не существует. Наиболее удобным для практических целей является использование приведенных выше уравнений или соотношения

$$K_m = \left(\frac{M_{st}}{M_i} \right)^{3/4} \quad (9.4)$$

Сигнал детектора по теплопроводности линейно увеличивается с уменьшением скорости газа. Это заставляет вводить дополнительные поправки при работе с переменной скоростью газа, например, при изменении температуры колонки при постоянном давлении на ее входе.

Кроме того, некоторое увеличение скорости, возникающее при выходе хроматографической зоны из колонки, также приводит к понижению чувствительности катарометра (так называемый эффект поднятия) [45].

При этом возникают дополнительные погрешности, которые, однако, существенно меньше индивидуальных отличий различных веществ и поэтому должны учитываться лишь при очень точных количественных определениях.

Привлекательной возможностью обойти затруднения, связанные с определением поправочных коэффициентов для катарометра, является применение так называемых конверсионных методов детектирования. При этом после колонки помещают реактор, в котором осуществляется конверсия всех выходящих из колонки веществ в какое-либо одно, которое и регистрируется детектором. Наибольшее распространение получила конверсионная система, в которой определяемые компоненты в токе азота сжигают на окиси меди при температуре $750^\circ C$ до CO_2 и воды; последнюю восстанавливают на металлическом железе при температуре $800-900^\circ C$ до водорода, который и детектируют после поглощения CO_2 щелочью [52]. При применении гелия система упрощается, так как отпадает необходимость восстановления воды. Ее поглощают ангидроном, а регистрируют CO_2 в токе гелия [53]. Наконец, используя в качестве газа-носителя водород, можно при помощи никелевого катализатора перевести определяемые компоненты в метан, который может быть зарегистрирован детектором [54, 55]. Все способы конверсионного детектирования приводят к тому, что детектор регистрирует газ, резко отличающийся по теплопроводности от газа-носителя. Из каждого моля определяемого компонента образуется несколько молей продукта конверсии, поэтому при-

менение конверсии позволяет резко повысить чувствительность детектирующего устройства. Добавочное повышение чувствительности можно получить, увеличивая ток накала нитей, так как большая устойчивость продуктов конверсии (CO_2 , H_2 , CH_4) позволяет не опасаться явлений крекинга и пиролиза, ограничивающих температуру нитей при обычном варианте детектирования. По данным работы [56], применение конверсии до CO_2 позволило повысить чувствительность детектирующей системы со 150 до 2500–3000 мВ мл/мг по *n*-гексану.

Количественная обработка хроматограмм существенно облегчается, так как градуировочными коэффициентами являются величины, обратно пропорциональные содержанию водорода (при конверсии до H_2) или углерода (при конверсии в CO_2) в определяемых веществах:

$$K_b = \frac{M_i}{n_k} \quad (9.5)$$

где M_i – молекулярная масса определяемого вещества, а n_k – число атомов, образующих продукт конверсии в его молекуле. Состав смеси может быть также рассчитан по следующей формуле:

$$P_i = \frac{S_i / P_{ki} \times 100}{\sum S_i / P_{ki}} \quad (9.6)$$

где S_i – площади пиков, а P_{ki} – процентное содержание атомов, образующих продукт конверсии в молекуле компонента i . Следует указать, что применение конверсионных методов позволяет термостатировать детектор при комнатной температуре, что значительно повышает его стабильность и облегчает работу при переменной температуре колонки.

9.3.2. Ионизационные детекторы

Обширная группа детектирующих устройств основана на измерении электрического тока электронного или ионного характера, возникающего в результате ионизации поступающих в детектор органических молекул. Это возможно вследствие того, что углерод обладает относительно низким потенциалом ионизации, равным 11,26 эВ, что позволяет разнообразными способами осуществить отрыв внешних электронов.

Существует два основных способа ионизации органических молекул: ионизация в пламени и ионизация действием возбужденных до метастабильного состояния атомов инертных газов (аргона, гелия и др.). Этот процесс называют эффектом Пеннинга [57].

Детекторы, использующие ионизацию метастабильными инертными атомами, различаются между собой способами возбуждения инертного газа. Для этой цели используют излучение радиоактивных изотопов, действие тлеющего разряда [58], радиочастотный разряд [59], действие ультрафиолетового света [60] и др. Наибольшее распространение в этой группе детекторов получили детекторы с радиоактивными изотопами, впервые предложенные в работе [61]. Схема такого β -ионизационного детектора с радиоактивным изотопом криптона представлена на рис. 9.2.

В первом ионизационном детекторе источником радиоактивного излучения являлся изотоп Sr^{90} . Большой период полураспада этого изотопа обеспечивает высокую стабильность детектирующей системы. Однако присущее Sr^{90} жесткое γ -излучение требует соблюдения мер предосторожности. В частности, при радиоактивности

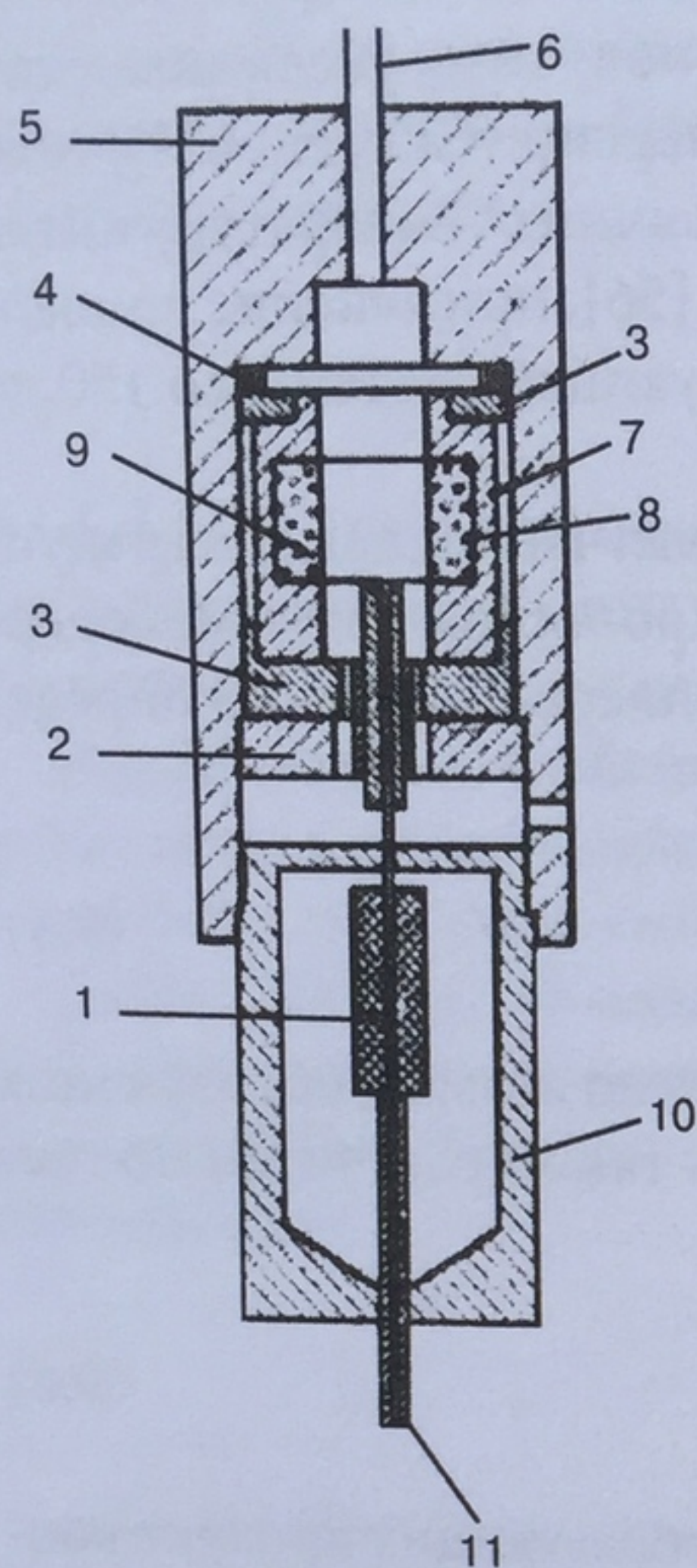


Рис. 9.2. Аргоновый микродетектор с радиоактивным криптоном:
1 и 3 – изоляторы; 2 – фиксирующее кольцо;
4 – уплотнительная прокладка;
5 – корпус; 6 – подвод вспомогательного потока аргона;
7 – ускоряющий электрод; 8 – полость с радиоактивным криптоном, закрытая никелевой фольгой толщиной 25 мкм;
9 – коллекторный электрод; 10 – основание детектора;
11 – капиллярная колонка

источника 200 мКюри какие-либо манипуляции с детектором, вынутым из защитного свинцового контейнера, не должны были проводиться в течение времени, большего 4 ч в неделю.

Разработан детектор с использованием прометия-147. Мягкое β -излучение прометия и отсутствие γ -излучения полностью устраняют возможность радиационного поражения, однако малый период полураспада прометия (от двух до 18 лет для разных изотопов) приводит к заметному изменению его чувствительности даже на протяжении коротких отрезков времени [62].

Сигнал ионизационного детектора обычно не зависит от температуры и скорости газа-носителя. Почти не влияют на его показания и особенности конструктивного оформления. В сочетании с высокой чувствительностью эти качества выдвигают ионизационные детекторы этого типа в число наиболее удобных для применения в хроматографической аппаратуре. Подавляющее число публикаций, в которых изучался вопрос количественного анализа с помощью ионизационных детекторов этой группы, относится к устройствам, использующим для возбуждения атомов инертного газа β -излучение радиоактивных изотопов, т. е. к β -ионизационным детекторам.

Показано что интегральный отклик β -ионизационного детектора пропорционален молекулярной массе вещества, однако связь сигнала с количеством вещества нелинейна, причем характер нелинейности различен для разных гомологических рядов [61]. Для метиловых эфиров жирных кислот и первичных спиртов нелинейность резко выражена только у первых членов гомологического ряда и с повышением молекулярной массы убывает. Для эфиров, кетонов и свободных кислот значительная нелинейность прослежена во всем изученном диапазоне изменения молекулярных масс (до 200 а. е. м.). В более поздних работах объясняли наличие нелинейности отклика захватом электронов способными к такому захвату функциональными группами, например, карбоксильной [62].

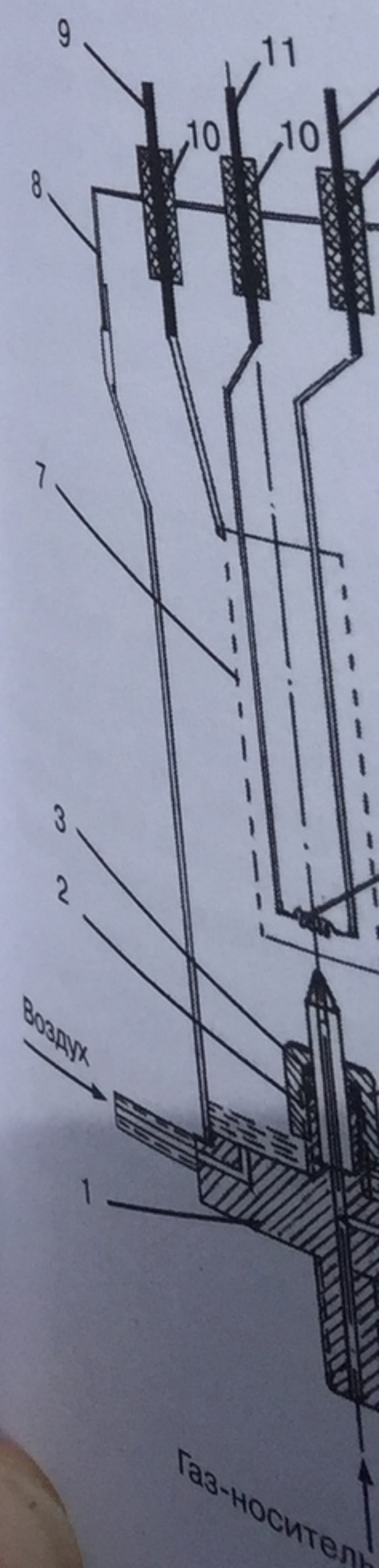
полученные результаты по-
длинительной мольной по

В литературе имеются до-
точные коэффициентах р
Если при работе с β -иониз
инертным газом, чувстви
детектратора, однако лин
коэффициенты, в этом случ
газа-носителя, стандар
исчислить заранее.

При исследовании рабо
могут быть вычислены для
соответствующим инкрементам

9.3.3. Пламенно-ионизационный

Основанный на иониза-
между электродами, к кот
пламенного ионизационн
достижений газовой хром



Аналогичные результаты получены в работе [63]. В этой работе предложена для определения относительной мольной поправки (по пеларгоновой кислоте) следующая формула:

$$\frac{1}{K_M} = 2,5lgh - 1,41 \quad (9.7)$$

В литературе имеются довольно многочисленные экспериментальные данные о поправочных коэффициентах различных классов соединений, например [64, 65].

Если при работе с β -ионизационным детектором не пользоваться в качестве носителя инертным газом, чувствительность детектора резко падает до уровня, характерного для катарометра, однако линейность детектора в этом случае улучшается. Поправочные коэффициенты, в этом случае зависят только от молекулярных масс и сечений ионизации газа-носителя, стандартного и определяемого компонентов, так что их можно вычислить заранее.

При исследовании работы такого детектора установлено, что сечения ионизации могут быть вычислены для каждого соединения по принципу аддитивности по соответствующим инкрементам [66].

9.3.3. Пламенно-ионизационный детектор

Основанный на ионизации молекул органических соединений в пламени водорода между электродами, к которым подводится постоянное напряжение (рис. 9.3), метод пламенного ионизационного детектирования является одним из самых выдающихся достижений газовой хроматографии. Впервые пламенно-ионизационный детектор был

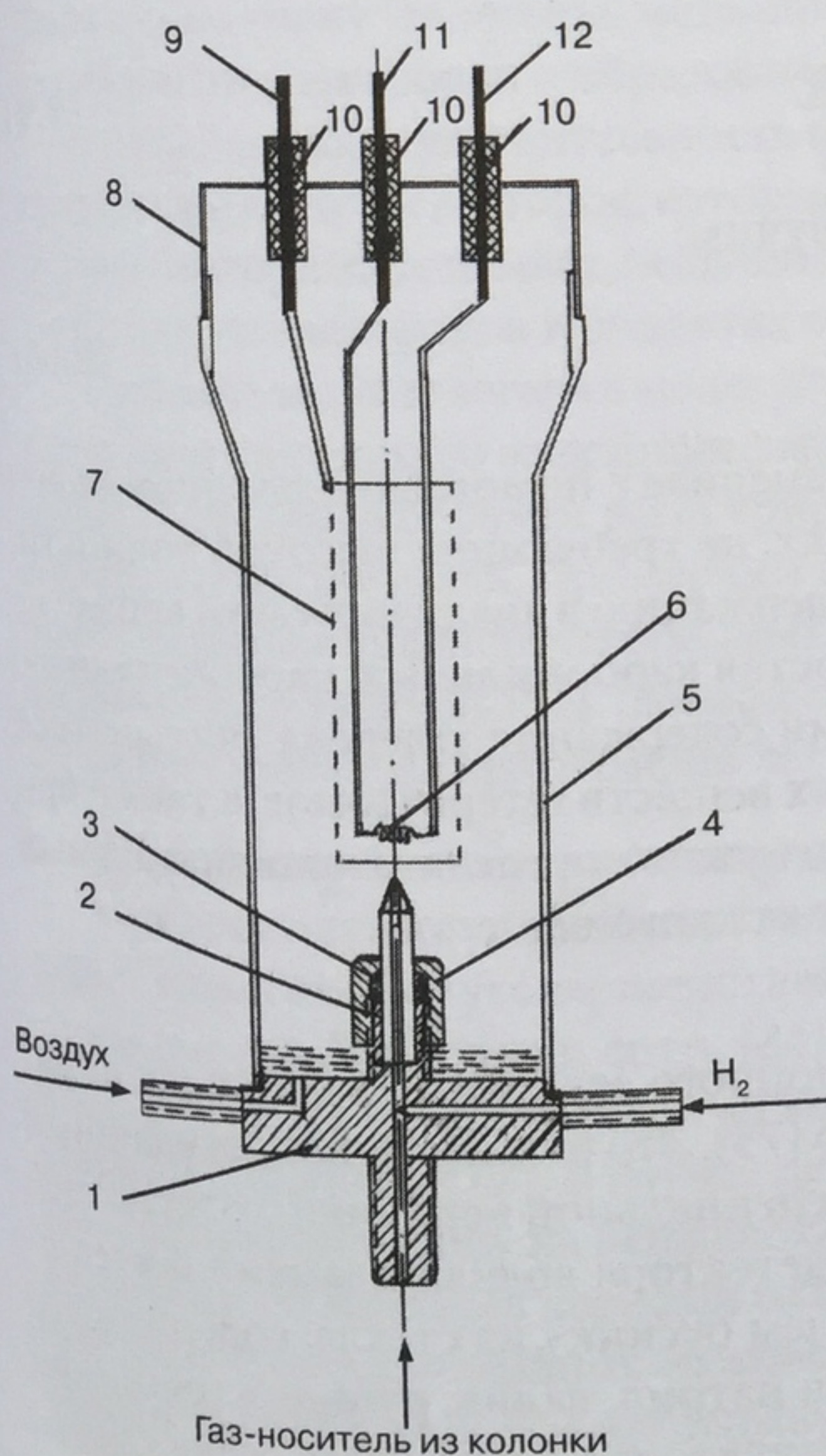


Рис. 9.3. Конструкция пламенно-ионизационного детектора, использовавшегося в лаборатории автора: 1 – корпус; 2 – кварцевая горелка; 3 – уплотнение; 4 – гайка; 5 – металлический экран; 6 – спираль для поджигания пламени; 7 – коллекторный сетчатый электрод; 8 – крышка; 9 – электроразъем для соединения с электрометрическим усилителем; 10 – изоляторы; 11 – полярирующий электрод, при поджигании пламени являющийся выводом спирали поджига; 12 – второй вывод спирали поджига

описан в 1958 г. [67]. В том же году появилось сообщение МакВильяма и Дьюара [68] об исключительно высокой чувствительности такого детектора, достигающей 10^6 мВ мл/мг. В настоящее время имеются многочисленные конструкции датчиков пламенного ионизационного детектора. Конструктивные усовершенствования детектора направлены на повышение устойчивости горения, автоматизацию зажигания пламени, улучшение изоляции электродов. Показания пламенно-ионизационного детектора зависят от структурных особенностей детектируемых веществ, а также от деталей конструкции детектора (формы и размеров электродов, расстояния между ними, конфигурации выходного отверстия горелки и т. п.) [69]. Режим работы детектора: напряжение на электродах, скорости газа-носителя, водорода и воздуха, подаваемого для поддержания горения, также оказывают значительное влияние на величину его отклика.

Относительно небольшое число работ, касающихся вопросов количественного анализа с помощью пламенно-ионизационного детектора, к сожалению, не свободно от противоречий. В ряде работ [70–72] содержатся утверждения, что хотя сигнал детектора в общем увеличивается с увеличением числа атомов углерода в молекуле, атомы, связанные с кислородом, азотом или галогеном, не увеличивают сигнал, так как в горении не участвуют [73].

Предлагают вводить поправки, зависящие от времени удерживания, и рассчитывать площади пиков по уравнению:

$$S = \tau_R (A_n + B) \quad (9.8)$$

где A и B – постоянные, различные для разных колонок. Пожалуй, наиболее простым является предложенное в работе [74] соотношение:

$$K_b = \frac{M_1 n_{st}}{M_{st} n_1} \quad (9.9)$$

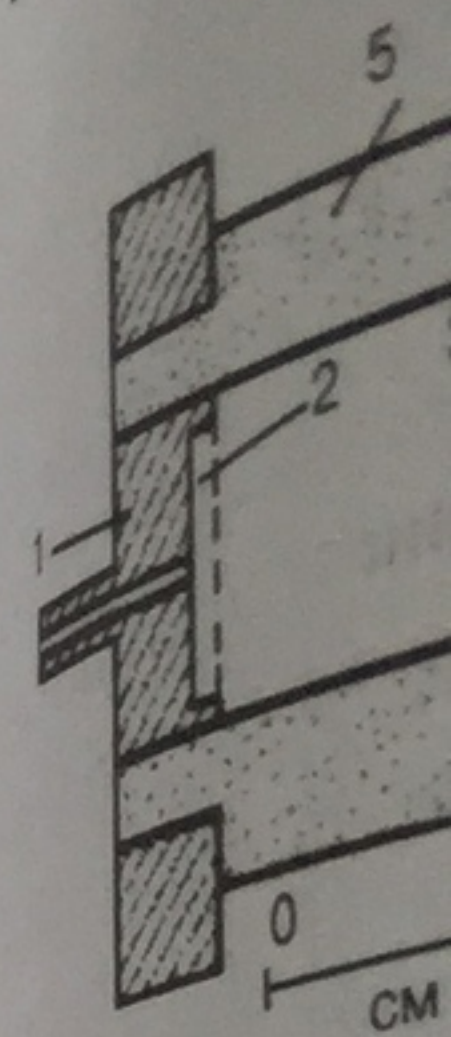
Умножив числитель и знаменатель на 1200, получим:

$$K_b = \frac{\%C_{st}}{\%C_i} \quad (9.10)$$

Резюмируя все изложенное о количественном анализе с помощью пламенно-ионизационного детектора, можно сказать, что в случаях, не требующих высокой точности, его отклик можно полагать пропорциональным содержанию в анализируемом веществе углерода. При этом атомы углерода, входящие в состав карбонильных, карбоксильных, ацетальных и ортоэфирных групп, при вычислении содержания углерода учитываться не должны. При наличии в молекулах определяемых веществ гетероатомов, а также при необходимости получения более точных результатов нужно определять индивидуальный отклик детектора на применяемой аппаратуре для каждого вещества.

9.3.4. Термоионный детектор

Интересной модификацией пламенно-ионизационного детектора является так называемый термоионный азотно-фосфорный детектор [75]. Это пламенно-ионизационный детектор, в котором сопло горелки выполнено из специальной керамики, содержащей соль щелочного металла. В других конструкциях детектора вблизи пламени помещают нагреваемую миниатюрным электронагревателем бусинку из стекла, содержащего рубидий или цезий. Присутствие в пламени ионов натрия, калия, рубидия или цезия обуславливает специфическую чувствительность детектора к веществам, содержащим



азот и фосфор. Д
ратов в биообъе
сельскохозяйств
ровать пикограм
к различным ве

9.3.5. Электроннозонный детектор

Электроннозонный детектор с н
β-излучатель с н
в пространстве м
3–10 В). Между э
При попадании
твом к электрон
молекулами эле
тока [76]. Высок
применения эти
торов в моторни
лических углево
Введение ато
позволяет с пом
вещество и так
определению пр
могут являться
тильных произ
является газова

9.3.6. Микроконденсаторный детектор

Микроконденсаторный детектор [83]. Существе
с ним внесли
Выходящий и
версионную я
ставляет собо
заполненную
при окислени
освобожденн

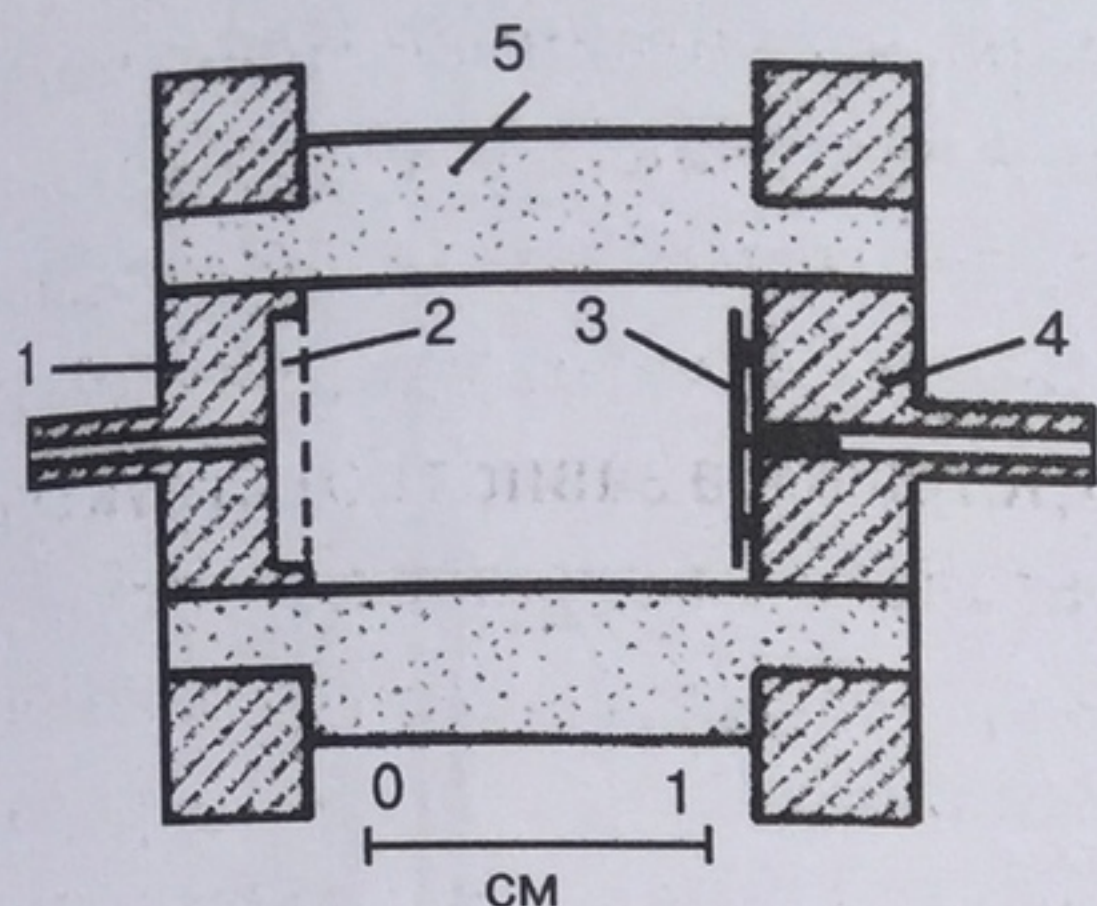


Рис. 9.4. Электроннозахватный детектор:
1 – анод; 2 – сетка;
3 – радиоактивный источник; 4 – катод;
5 – фторопластовый изолятор

азот и фосфор. Детектор применяется для оценки содержания лекарственных препаратов в биообъектах, азотистых и фосфорорганических соединений, ядохимикатов в сельскохозяйственной продукции. Азотно-фосфорный детектор позволяет регистрировать пикограммовые количества веществ, однако линейность его невелика, а отклик к различным веществам изучен недостаточно.

9.3.5. Электроннозахватный детектор

Электроннозахватный детектор основан на следующем принципе. Радиоактивный β -излучатель с низкой энергией излучения (тритий, прометий, никель-63 и др.) помещается в пространстве между электродами, создающими слабое электрическое поле (напряжение 3–10 В). Между электродами возникает ток, обусловленный электронной проводимостью. При попадании в пространство между электродами атомов и молекул с большим сродством к электрону (галогены, металлоорганические соединения) происходит захват этими молекулами электронов с образованием тяжелых ионов, что вызывает резкое снижение тока [76]. Высокая чувствительность и избирательность действия обусловили узкую сферу применения этих детекторов, которые используются для определения следов антидетонаторов в моторных топливах, пестицидов в различных биологических продуктах, полициклических углеводородов в объектах окружающей среды и др. (рис. 9.4) [77–80].

Введение атома галогена в молекулу подлежащего определению органического вещества позволяет с помощью электроннозахватного детектора избирательно детектировать это вещество и таким образом регистрировать его на фоне большого количества мешающих веществ и таким образом регистрировать его на фоне большого количества мешающих веществ и таким образом регистрировать его на фоне большого количества мешающих веществ. Примерами такого применения электроннозахватного детектора могут являться анализы стероидных гормонов и аминокислот в форме их трифтороацетильных производных [81]. Важной сферой применения электроннозахватного детектора является газовая хроматография летучих хелатных комплексов металлов.

9.3.6. Микрокондуктометрический детектор

Микрокондуктометрический детектор предложен в 1962 г. Пирингером и Паскалау [83]. Существенные усовершенствования в конструкцию детектора и методику работы с ним внесли Дийкстра и сотр. [84]. Конструкция детектора представлена на рис. 9.5. Выходящий из хроматографической колонки газ направляется в миниатюрную конверсионную ячейку (2). В случае детектирования органических соединений она представляет собой трубку из нержавеющей стали длиной 100–150 мм и диаметром 1–2 мм, заполненную мелкими зернами окиси меди и нагретую до 750–800° С. Образующийся при окислении выходящих из колонки фракций углекислый газ растворяется в воде, освобожденной от ионов пропусканием через слой ионообменной смолы в колонке (1).

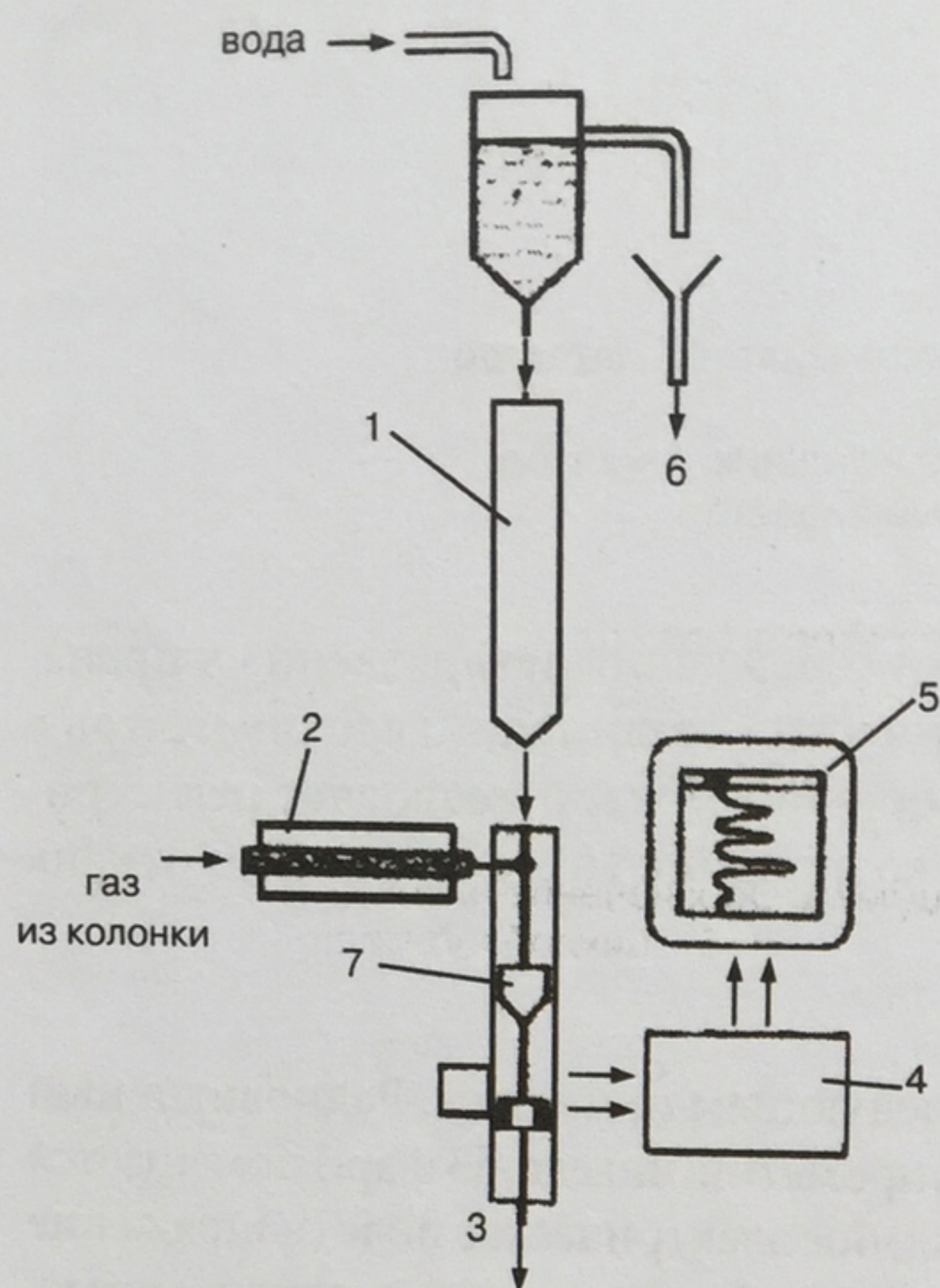


Рис. 9.5. Схема электрокондуктометрического детектора: 1 – колонка с ионообменной смолой для очистки воды; 2 – реактор с оксидом меди для сжигания веществ, покидающих хроматографическую колонку; 3 – микрокондуктометрическая ячейка; 4 – электрокондуктометр; 5 – самописец; 6 – слив избытка воды; 7 – фазоразделитель

Расход воды обычно не превышает 20–30 мл/час. В полости датчика (3) происходит отделение воды от газа-носителя, который покидает детектор через специальное отверстие. Содержащая CO_2 вода проходит в канал между двумя электродами, где измеряется ее электропроводность.

Чувствительность этого детектора оказывается сравнимой с чувствительностью ионизационных детекторов, так что он может применяться с капиллярными колонками, а простота, надежность и отсутствие радиоактивных источников, высоких напряжений и открытого пламени делают этот детектор особенно привлекательным. Поправочные коэффициенты при работе с таким детектором оказываются, как и в случае детектора по теплопроводности с конверсией, величинами, пропорциональными содержанию углерода в регистрируемых компонентах.

В некоторых случаях микрокондуктометрический детектор может использоваться и для анализа неорганических веществ. Так, изотопы водорода детектировали, заменив нагретую трубку с оксидом меди на трубку с нанесенным на асбест хлоридом палладия при комнатной температуре [85]. Покидающие хроматографическую колонку разделенные изотопы водорода при этом количественно превращались в HCl и DCl , что обеспечивало очень высокую чувствительность детектирующей системы.

Существует большое число других детектирующих устройств, распространенных значительно меньше. В ряде монографий и обзоров имеются обширные сводки поправочных коэффициентов многих веществ для различных типов детекторов [86–90].

Ниже на рис. 9.6–9.10 приведены типичные примеры определения лекарственных, наркотических средств и допинговых веществ с помощью метода газовой хроматографии [91–95].

Весьма важной особенностью метода газовой хроматографии является возможность разделения и количественного определения оптических изомеров различных ле-

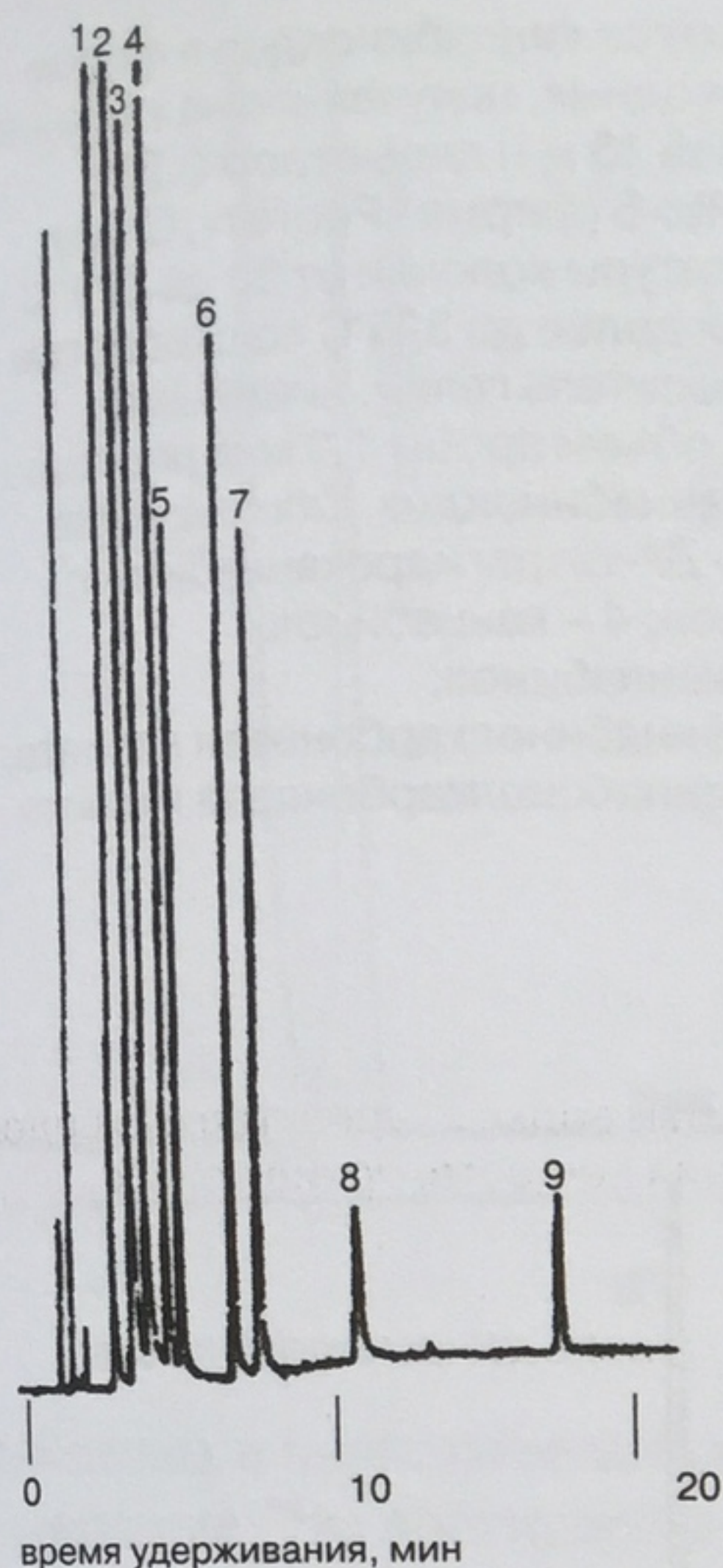


Рис. 9.6. Хроматограмма смеси барбитуратов в форме свободных кислот на колонке с 3% полисилоксана OV-17. Программирование температуры колонки от 150 до 260° С со скоростью нагрева 8 град/мин. Обозначение пиков:
 1 – барбитал; 6 – циклобарбитал;
 2 – амобарбитал; 7 – клофелин;
 3 – пентабарбитал; 8 – гексамидин;
 4 – секобарбитал; 9 – гидроксифенобарбитал;
 5 – фенобарбитал;

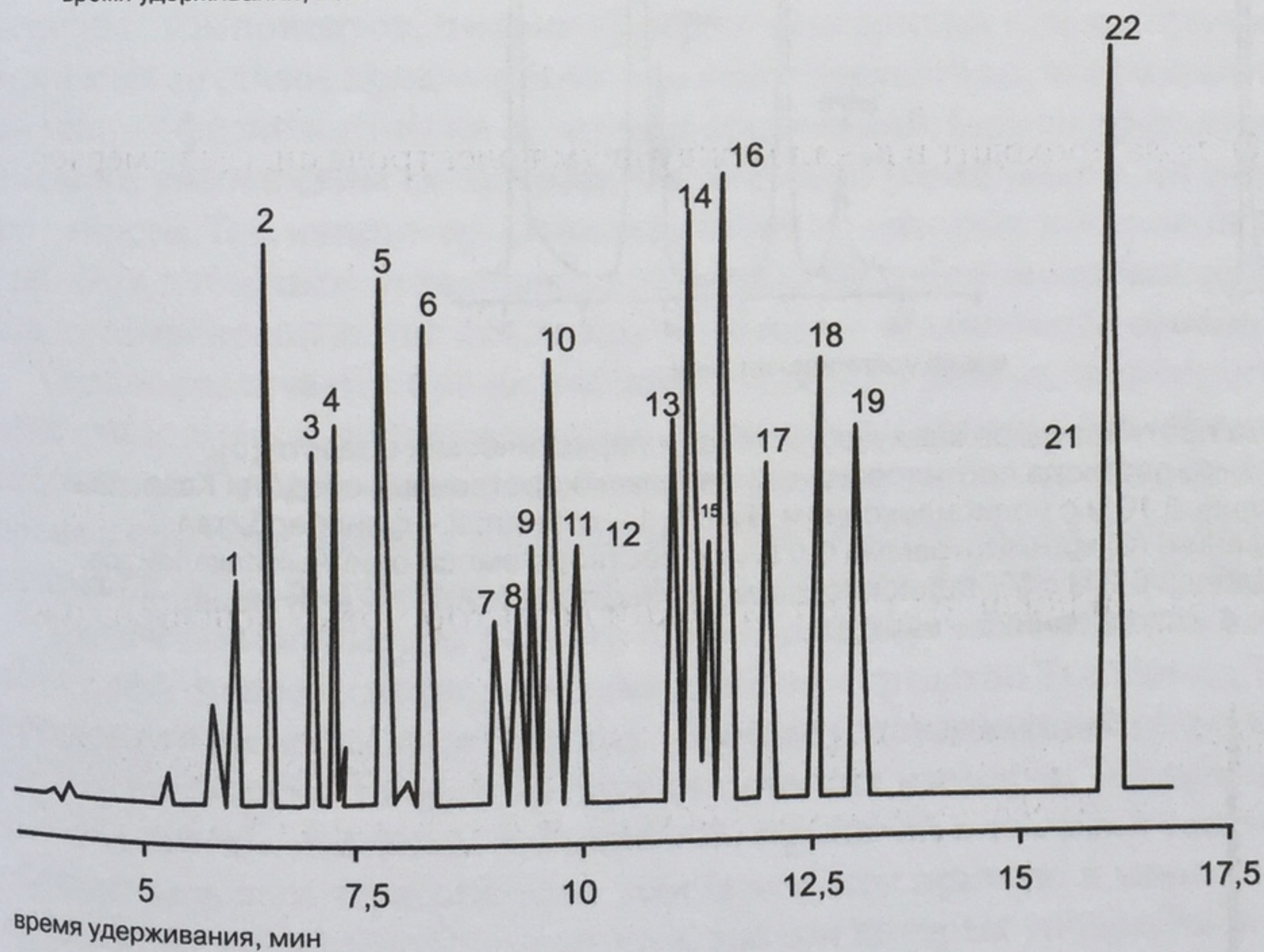


Рис. 9.7. Хроматограмма смеси симпатомиметических аминов: 1 – фенилэтиламин; 2 – амфетамин; 3 – фентермин; 4 – метамфетамин; 5 – фенфлурамин; 6 – мефентермин; 7 – катинон; 8 – фенилпропаноламин; 9 – меткатинон; 10 – никотин; 11 – эфедрин; 12 – псевдоэфедрин; 13 – фенметразин; 14 – фендиметразин; 15 – метилendiоксиамфетамин; 16, 17 – метамфетамин; 18 – метилendiоксиэтиламфетамин; 19 – 4-метил-2,5-диметокси-амфетамин; 21 – кофеин; 22 – бензфетамин. Кварцевая капиллярная колонка длиной 30 м и диаметром 0,25 мм с неподвижной фазой Rtx-5Amine (фирма «Рестек», США), толщина пленки 0,5 мкм; программирование температуры от 100 до 310° С со скоростью нагрева 10 град/мин. Деление потока на входе 1:45

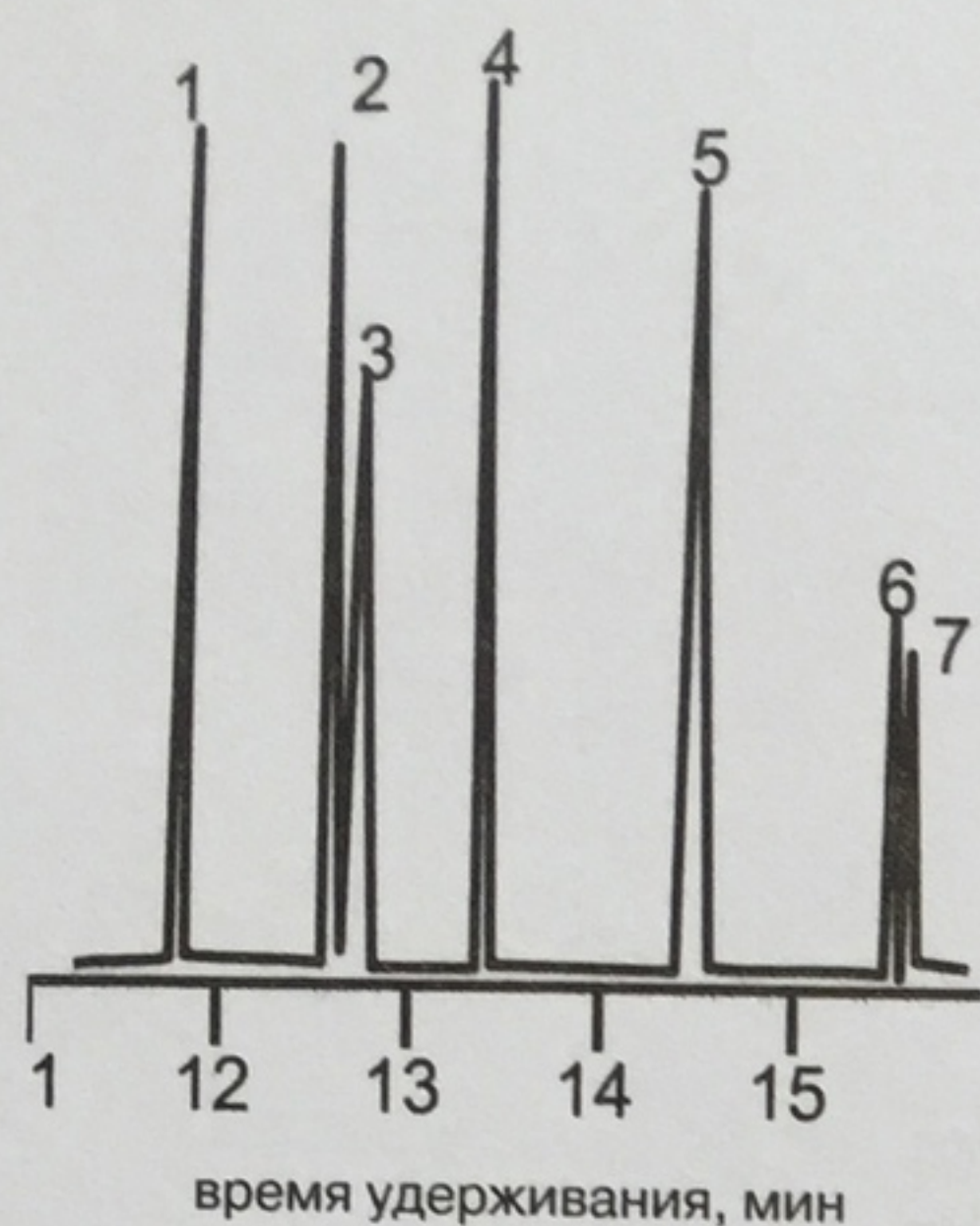


Рис. 9.8. Хроматограмма смеси каннабиноидов в форме триметилсилильных производных, полученная на кварцевой капиллярной колонке длиной 15 м и диаметром 0.25 мм с неподвижной фазой Rtx-5 (фирма «Рестек», США); программирование температуры колонки от 50 до 225°С со скоростью 30 град/мин и далее до 325°С со скоростью нагрева 10 град/мин; газ-носитель гелий, линейная скорость 40 см/с при 50°С; объем пробы 1,0 мкл раствора, содержащего 100 мкг/мл каннабиноидов. Обозначение пиков: 1 – каннабидиол; 2 – Δ^8 -тетрагидроканнабинол; 3 – Δ^9 -тетрагидроканнабинол; 4 – каннабинол; 5 – 11-окси- Δ^9 -тетрагидроканнабинол; 6 – 11-нор- Δ^9 -тетрагидроканнабинолкарбоновая кислота; 7 – 11-нор- Δ^8 -тетрагидроканнабинолкарбоновая кислота 240°С 2

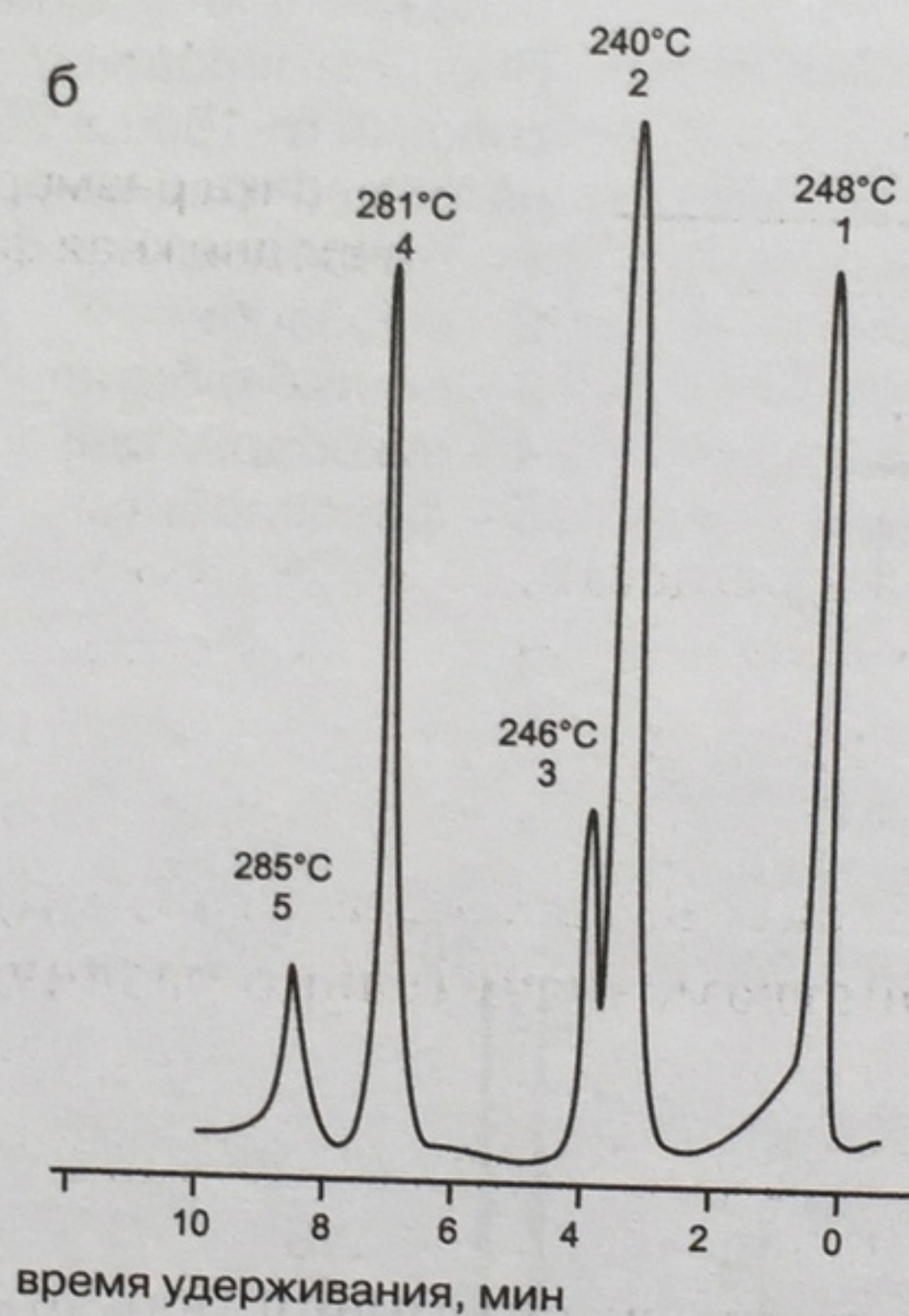
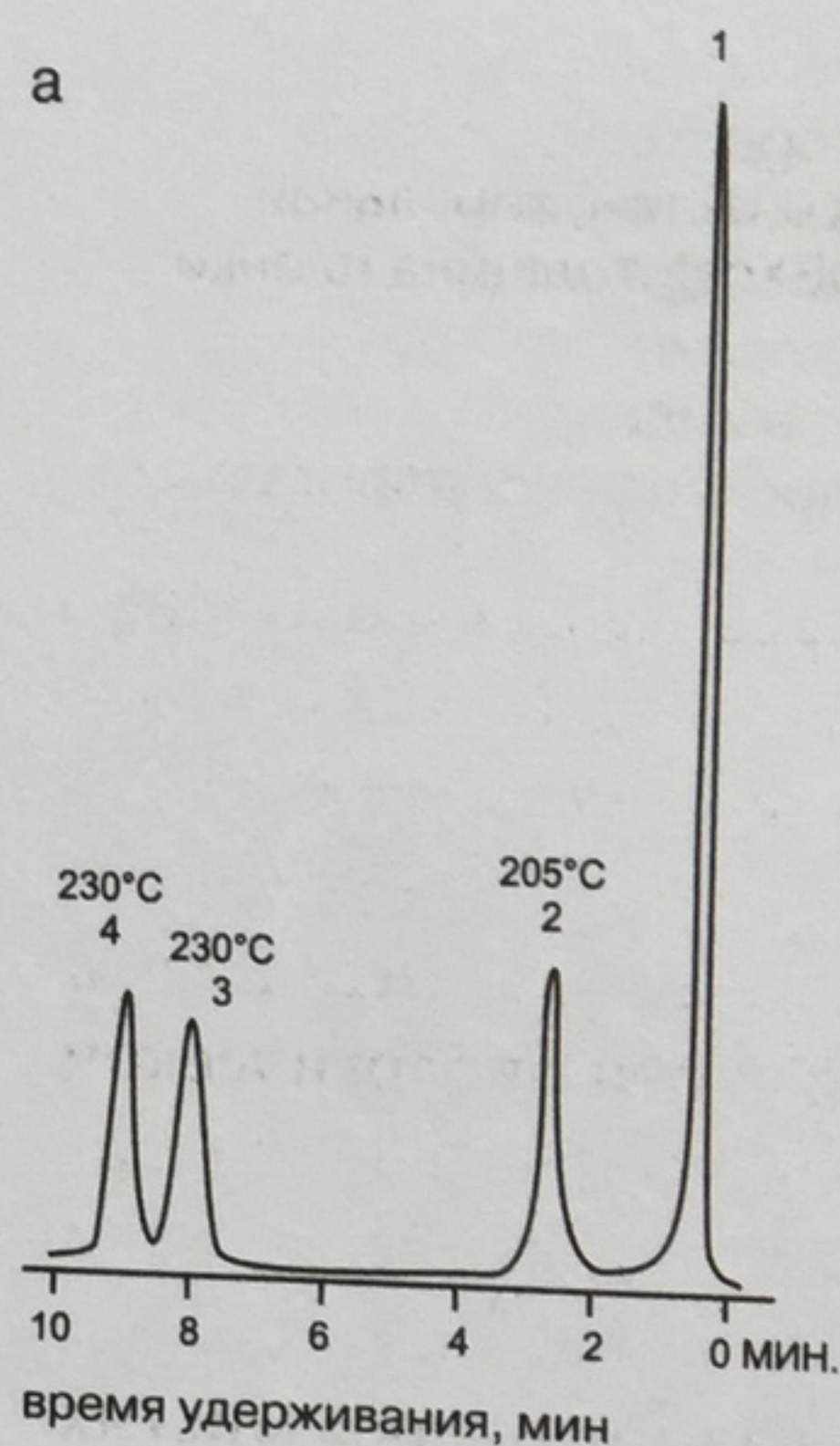


Рис. 9.9. Хроматограмма противосудорожных лекарств (а) и наркотических средств (б): (а) хроматограмма 0,1 %-го раствора противосудорожных лекарственных средств. Кварцевая капиллярная колонка длиной 10 м с полисилоксаном OV-17: 1 – этанол; 2 – фенобарбитал; 3 – гексамидин; 4 – дифенин; (б) хроматограмма 0,01 %-го раствора смеси опийных алкалоидов. Наполненная колонка длиной 0,3 м с 5% полисилоксана на Инертоне N AW; 1 – н-бутанол; 2 – кодеин; 3 – морфин; 4 – папаверин; 5 – наркотин

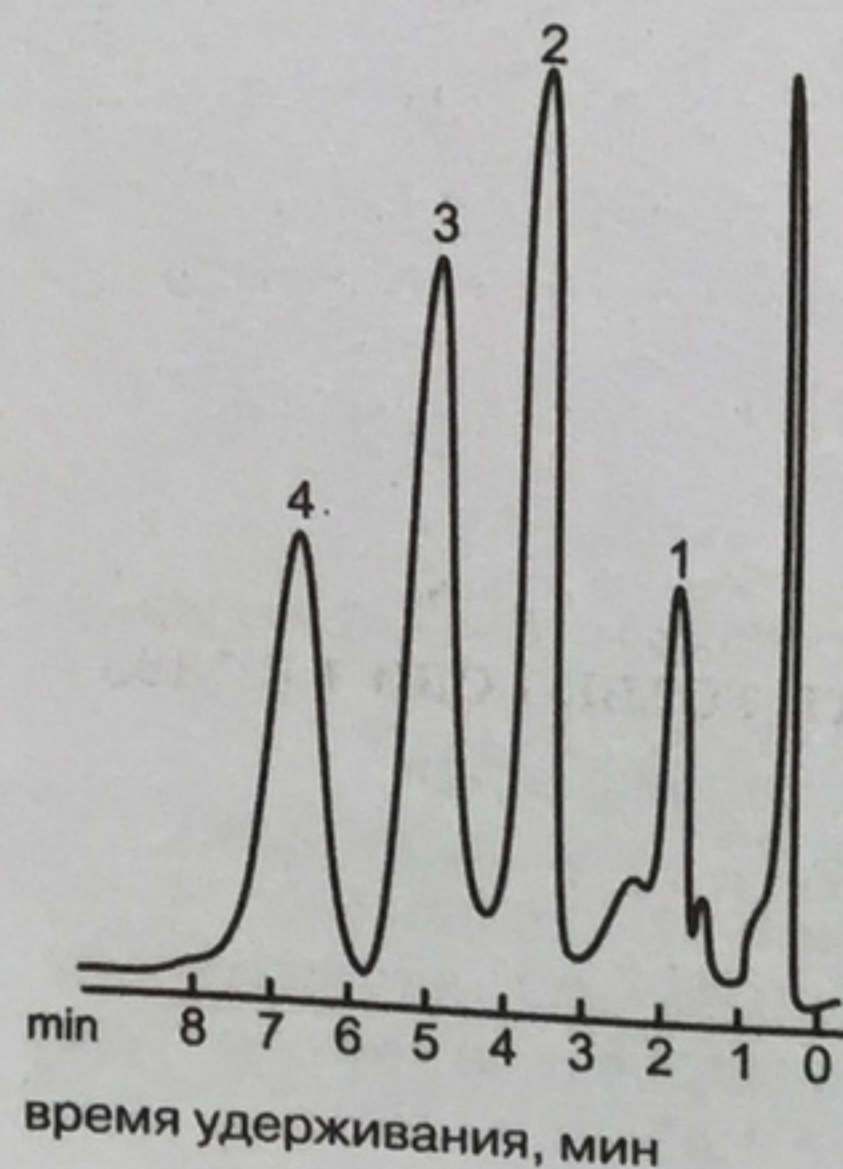


Рис. 9.10. Хроматограмма смеси природных стерина, полученная в потоке парообразной подвижной фазы (водяного пара). Колонка длиной 2 м с 5% полисилоксана XE-60 на Хроматоне N; температура 220°С, давление пара 0,13 кг/см²: 1 – эргостерин; 2 – холестерин; 3 – стигмастерин; 4 – диосгенин.

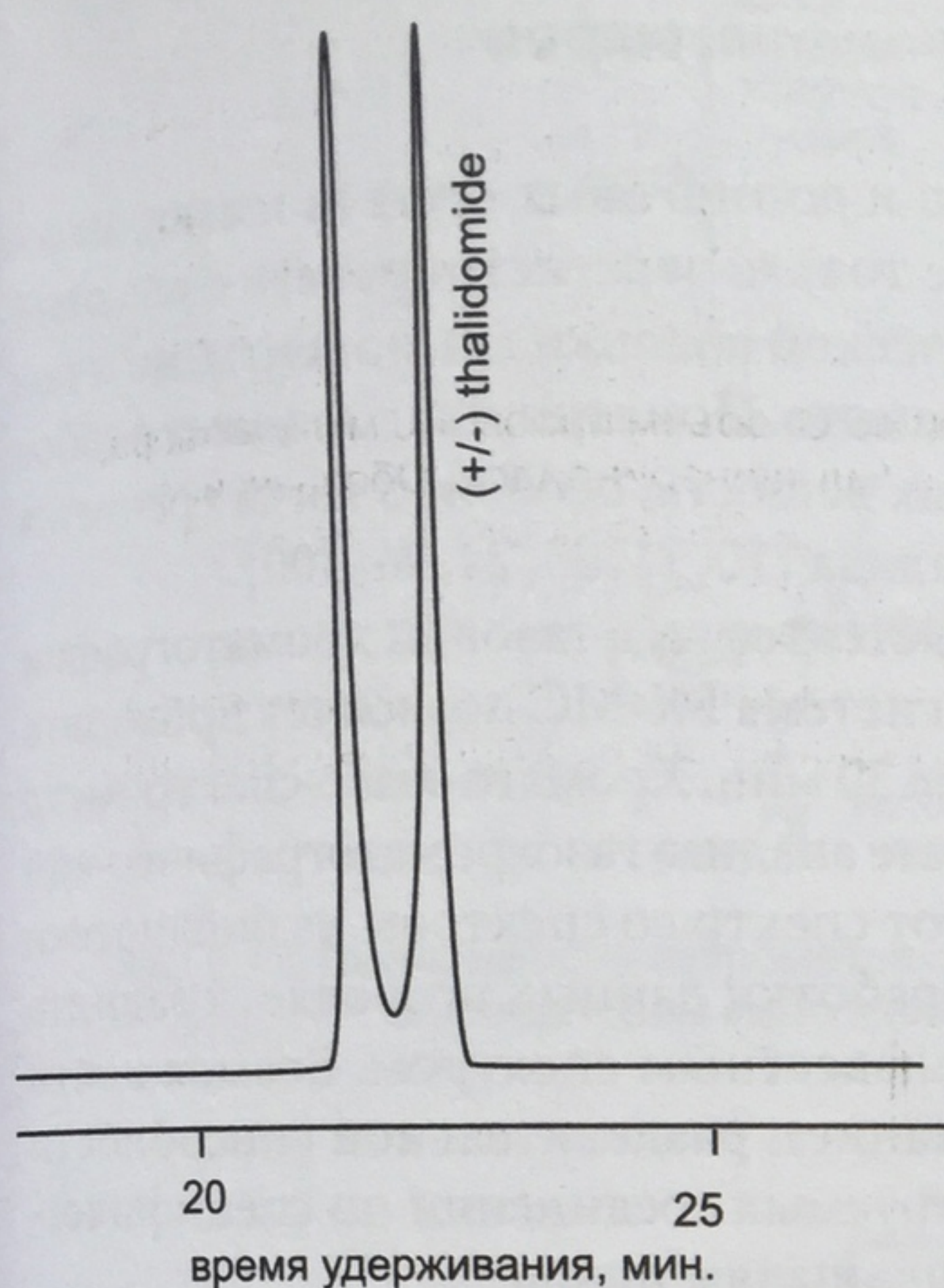


Рис. 9.11. Хроматограмма смеси двух оптических изомеров талидомида. Кварцевая капиллярная колонка размером 30 м x 0,32 мм; хиральная неподвижная фаза Rt-bDEXcst; толщина пленки 0,25 мкм; программирование температуры колонки от 200 до 230°C со скоростью 1 град/мин. Газ-носитель водород; линейная скорость 80 см/с

карственных и наркотических веществ, во многих случаях без перевода их в какие-либо производные. Это достигается путем введения в состав неподвижной фазы оптически активных компонентов, например, циклодекстринов или их производных. Важность этого вида анализов продиктована тем обстоятельством, что разные оптические изомеры многих физиологически активных соединений, будучи практически идентичными по своим химическим свойствам, значительно различаются по своей биологической активности. Так, например, аминокислоты, из которых построены белки высших организмов, в том числе и человека, представляют собой левовращающие изомеры, тогда как их правовращающие антиподы вообще не усваиваются организмами.

Сильно различается биологическая активность разных оптических изомеров многих лекарств, гормонов, простагландинов, ферментов и других жизненно важных химических соединений. Это объясняет значительный интерес, который проявляется в настоящее время к проблеме анализа и разделения смесей оптических изомеров в самых разнообразных областях фармации, медицины, биохимии и химической технологии.

Трагическим примером разного биологического действия оптических антиподов является седативное и снотворное лекарственное средство Талидомид. Этот препарат был предложен в шестидесятые годы как хорошее успокаивающее средство для беременных. Однако оказалось, что один из двух оптических изомеров Талидомида, получавшийся вместе с другим, полезным изомером по принятой в то время технологии его синтеза, обладает сильным тератогенным действием, что привело к многочисленным случаям врожденных уродств новорожденных, матери которых употребляли это лекарство.

В дальнейшем технология получения этого вещества была изменена таким образом, что его продажные фармацевтические препараты стали содержать только один полезный изомер [96, 97].

На рис. 9.11 приведена типичная хроматограмма образца Талидомида, полученного по старой технологии, когда при синтезе образовывались оба оптических изомера в равных количествах. Условия анализа указаны в подписи к рис. 9.11 [92].

9.3.7. Сочетание капиллярной газовой хроматографии с масс-спектрометрией

Особое значение для определения наркотиков и допинговых средств имеют масс-спектрометрические детекторы, позволяющие не только зарегистрировать с высокой чувствительностью выходящие из хроматографической колонки компоненты, но и получить информацию о составе и строении этих веществ. Понятно, что это имеет особое значение при анализе наркотических и допинговых веществ, особенно когда требуется доказать их присутствие в изучаемом объекте анализа [10, 11, 23, 24, 96–100].

Масс-спектрометры используются в качестве детекторов в газовой хроматографии уже более 30 лет. Современная комбинированная система ГХ-МС позволяет проводить анализ сложной смеси из 25 компонентов в течение 30 мин. Хромато-масс-спектрометр позволяет охарактеризовать полученный в результате анализа газохроматографический пик соответствующим масс-спектром, сравнив этот спектр со спектром из библиотеки спектров, хранящейся в базе данных. Система обработки данных позволяет сравнить стандартный спектр известного соединения с неизвестным спектром. Возможности хромато-масс-спектрометрии обусловлены сочетанием разделительной способности газовой хроматографии, идентификации анализируемых соединений по специфическим масс-спектрам и количественной оценки по площадям пиков.

Популярность масс-спектрометров как детекторов для газовой хроматографии в первую очередь вызвана тем, что использование гибридного метода позволяет получать большое количество специфической информации. По сравнению с другими детекторами масс-спектрометр более универсален, а получаемая с его помощью информация характеризуется большей специфичностью. В отличие от других детекторов, чувствительных лишь к определенным классам соединений (так, электроннозахватный детектор чувствителен только к галогенсодержащим соединениям, а пламенно-ионизационный – к углеводородам), масс-спектрометр позволяет детектировать любые органические соединения. Различие между другими детекторами и масс-спектрометром состоит в том, что в последнем детектирование осуществляется в соответствии с массой молекулы, т.е. с тем физическим свойством, которое присуще всем органическим соединениям.

Масс-спектр состоит из отдельных полос, высота которых соответствует относительному содержанию отдельных ионов анализируемого соединения как функции массы. Эти ионы несут информацию о молекулярной массе и наиболее электронно-стабильных фрагментах исходной молекулы. По таким специфическим фрагментам можно, основываясь на атомной структуре, охарактеризовать молекулу анализируемого соединения.

Масс-спектрометр состоит из 4 основных частей: 1) ионного источника; 2) анализатора масс; 3) детектора и 4) системы управления и обработки данных (рис. 9.12).

Ионный источник. Для получения ионов в масс-спектрометрах наиболее часто используется ионизация посредством электронного удара или химическая ионизация. До настоящего времени большинство масс-спектров получали с использованием ионизации электронным ударом. На рис. 9.13 представлена схема ионного источника электронного удара.

Анализатор масс. Для разделения ионов, образовавшихся в ионном источнике, используются анализаторы масс шести основных типов: 1) магнитные, 2) электростатические, 3) времяпролетные, 4) ионно-циклотронного резонанса, 5) квадрупольные,

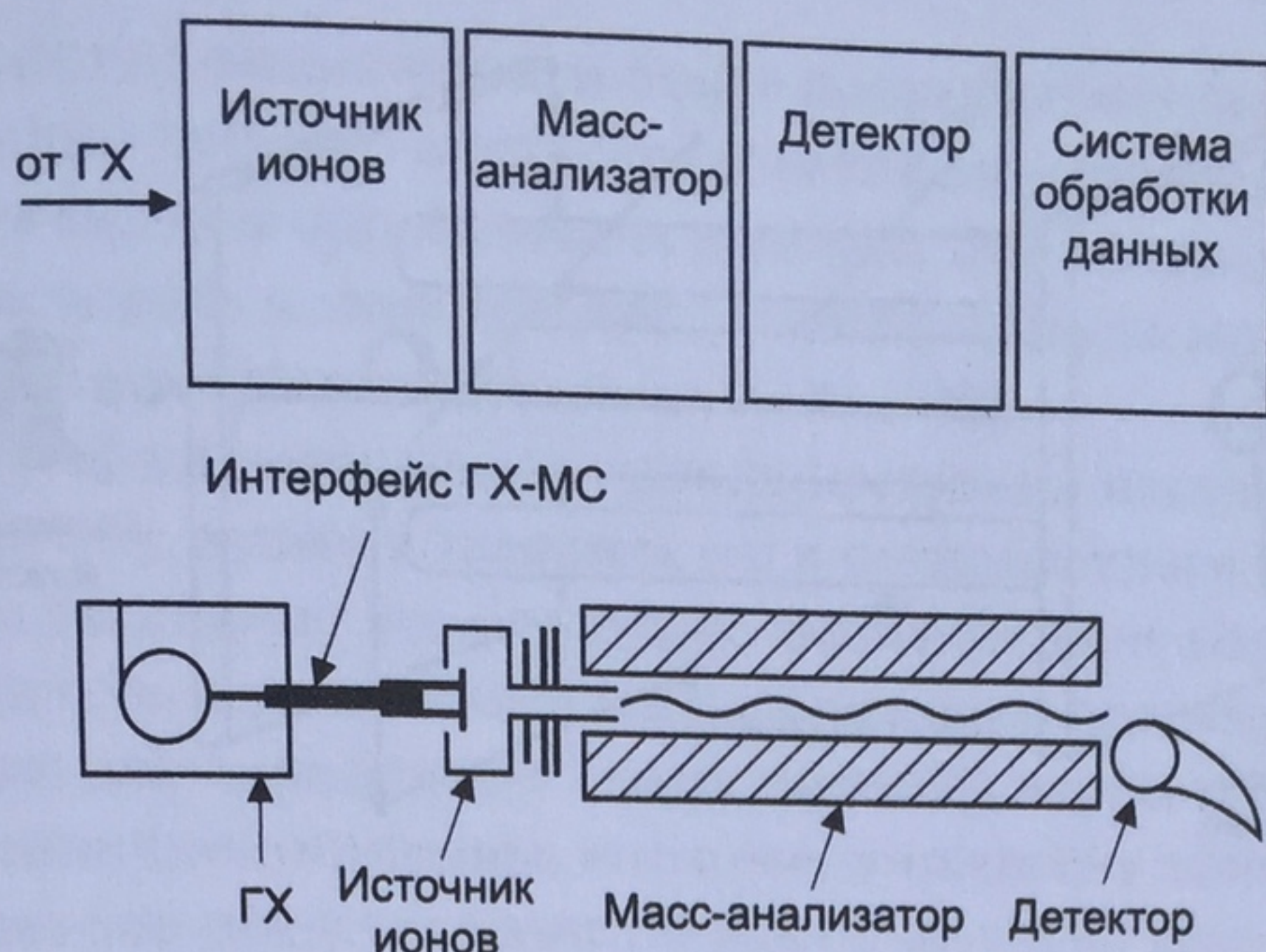
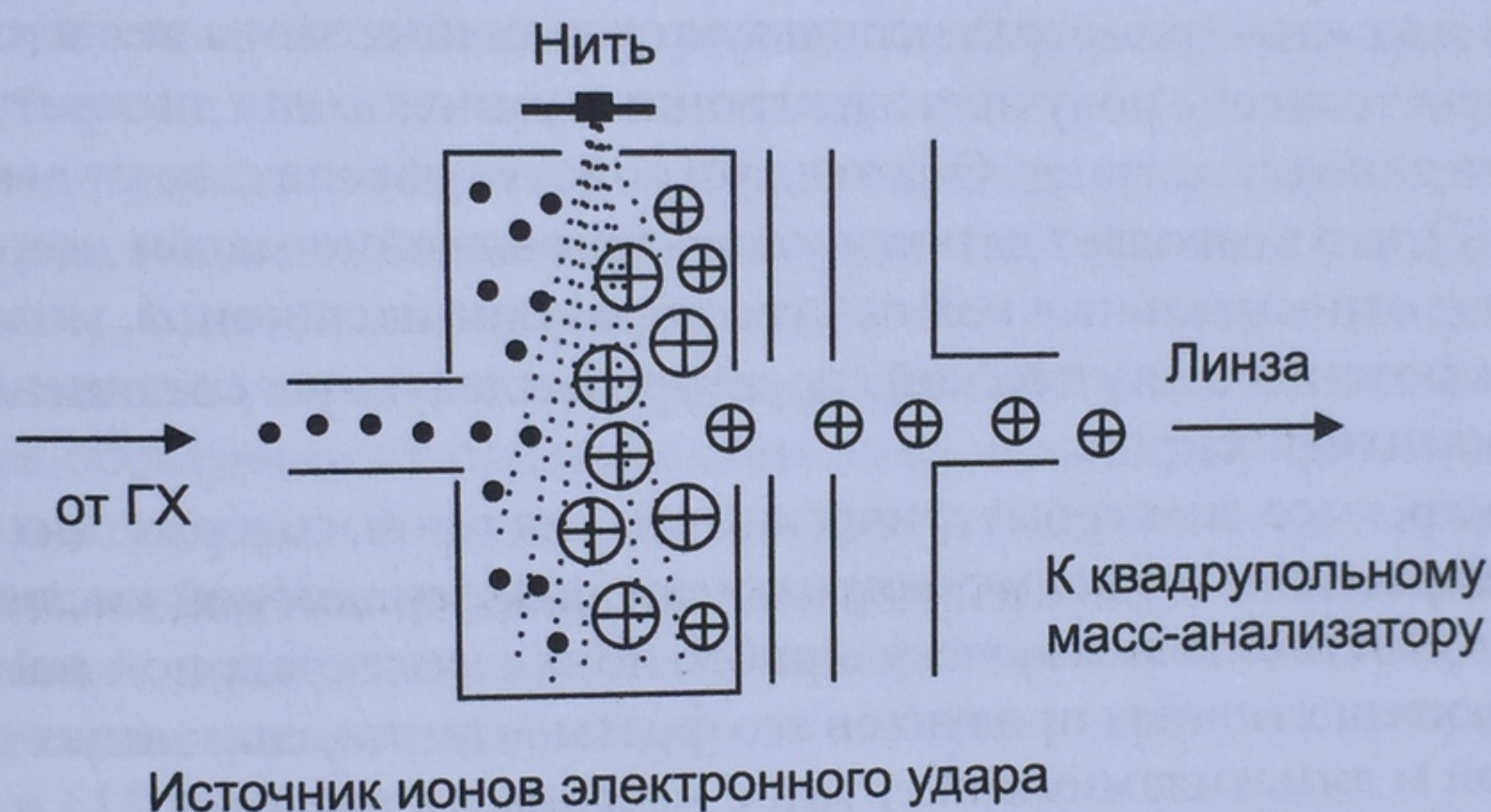


Рис. 9.12. Схема масс-спектрометра с ионным источником электронного удара, квадрупольным анализатором масс и электронным умножителем непрерывного типа



Источник ионов электронного удара

Рис. 9.13. Ионный источник электронного удара для генерирования ионов из парообразных молекул, выходящих из газохроматографической колонки

и б) ионные ловушки. Весьма распространены квадрупольные анализаторы (рис. 9.14). Разделение в них ионов осуществляется за счет различного поведения ионов в поле высокочастотного и постоянного тока.

Комбинированное высокочастотное переменное и постоянное электрическое напряжение вида $U = V + U_0 \cos \omega t$, подаваемое на систему четырех электродов, вынуждает ионы совершать колебательное движение в такт с частотой этого поля. При определенных величинах V , U_0 в выходную щель масс-анализатора будут проходить только ионы с определенной массой m , отвечающей условию:

$$m = a U_0 / V^2,$$

где a – некоторая постоянная прибора. Все ионы с отличными массами будут двигаться с нарастающими амплитудами колебаний, что приведет к их нейтрализации на электродах. Путем изменения амплитуды высокочастотного напряжения U_0 или его частоты масс-анализатор настраивают на регистрацию ионов той или иной требуемой массы.

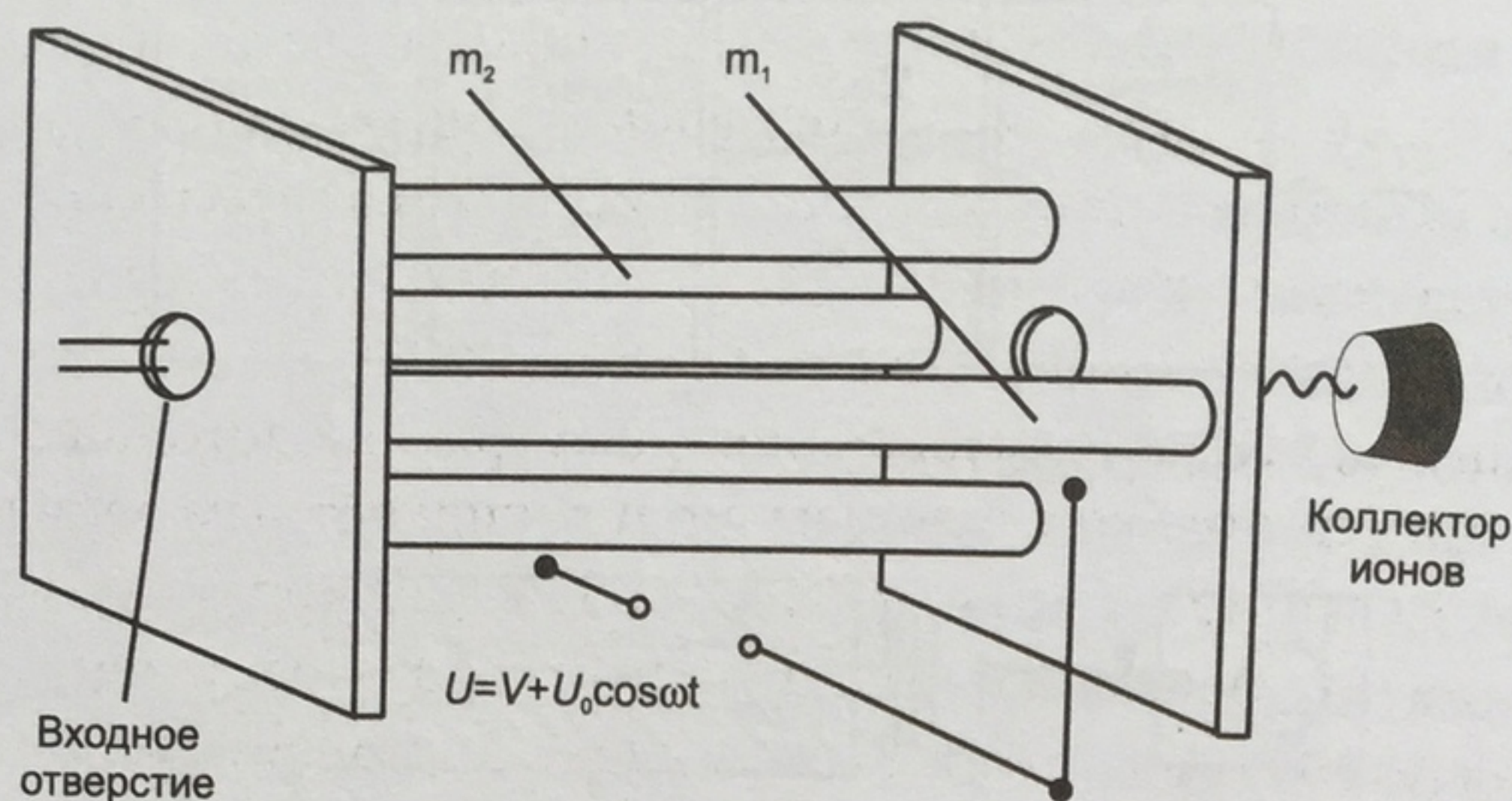


Рис. 9.14 Схема квадрупольного масс-анализатора

Детектор. В масс-спектрометрах используют различные типы детекторов, однако наибольшее распространение получили электронные умножители дискретного диодного и непрерывного диодного типов. Оба этих устройства обеспечивают высокие значения усиления (до 10^7), что позволяет детектировать чрезвычайно малые ионные токи.

Зная массы и относительные количества образующихся ионов, можно сделать определенные заключения о химической структуре исследуемых соединений, то есть осуществить его идентификацию.

Так, например, масс-спектрометрический анализ проб, содержащих очень сильнодействующее наркотическое вещество диэтиламид лизергиновой кислоты (ЛСД), позволяет зафиксировать сигналы молекулярного иона с молекулярной массой 324 а.е.м. и ионы двух характеристичных продуктов его фрагментации, связанных с отщеплением диэтиламидной и диметиламинной групп с массовыми числами 223 и 281, соответственно (схема 9.1). Наличие этих ионов в масс-спектре в их определенном соотношении позволяет однозначно идентифицировать ЛСД в анализируемой пробе [103].

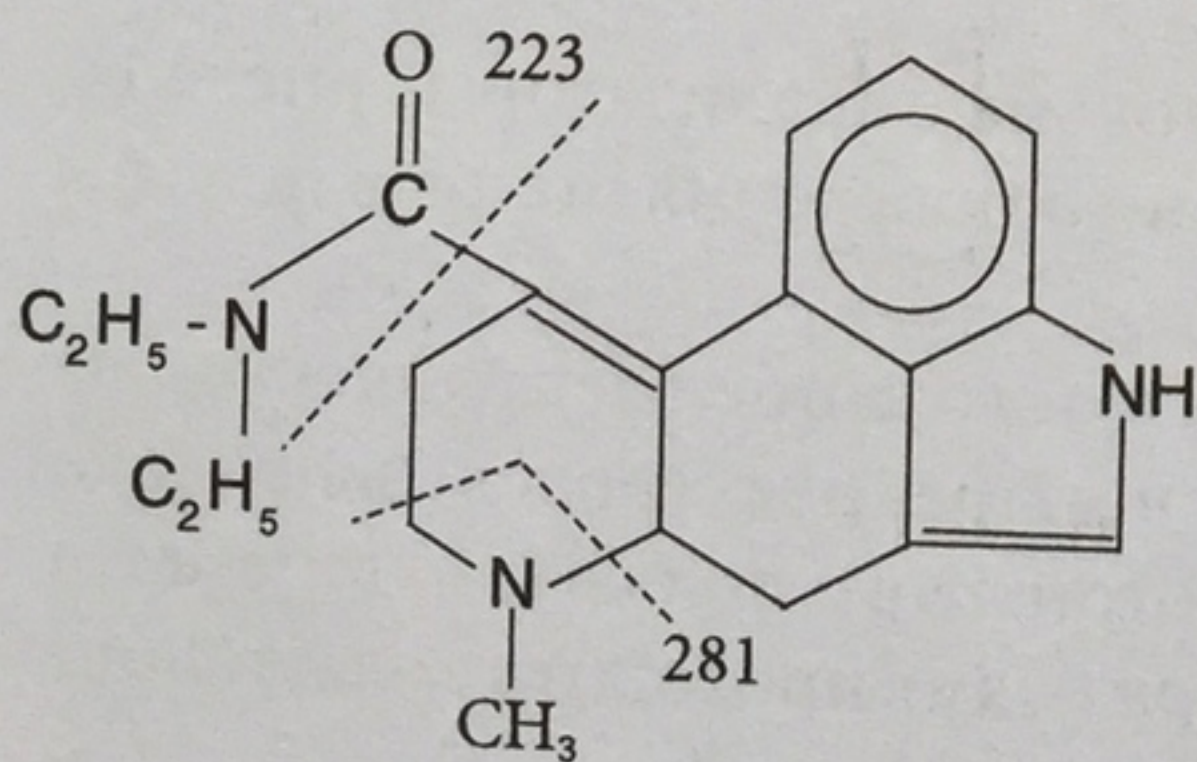
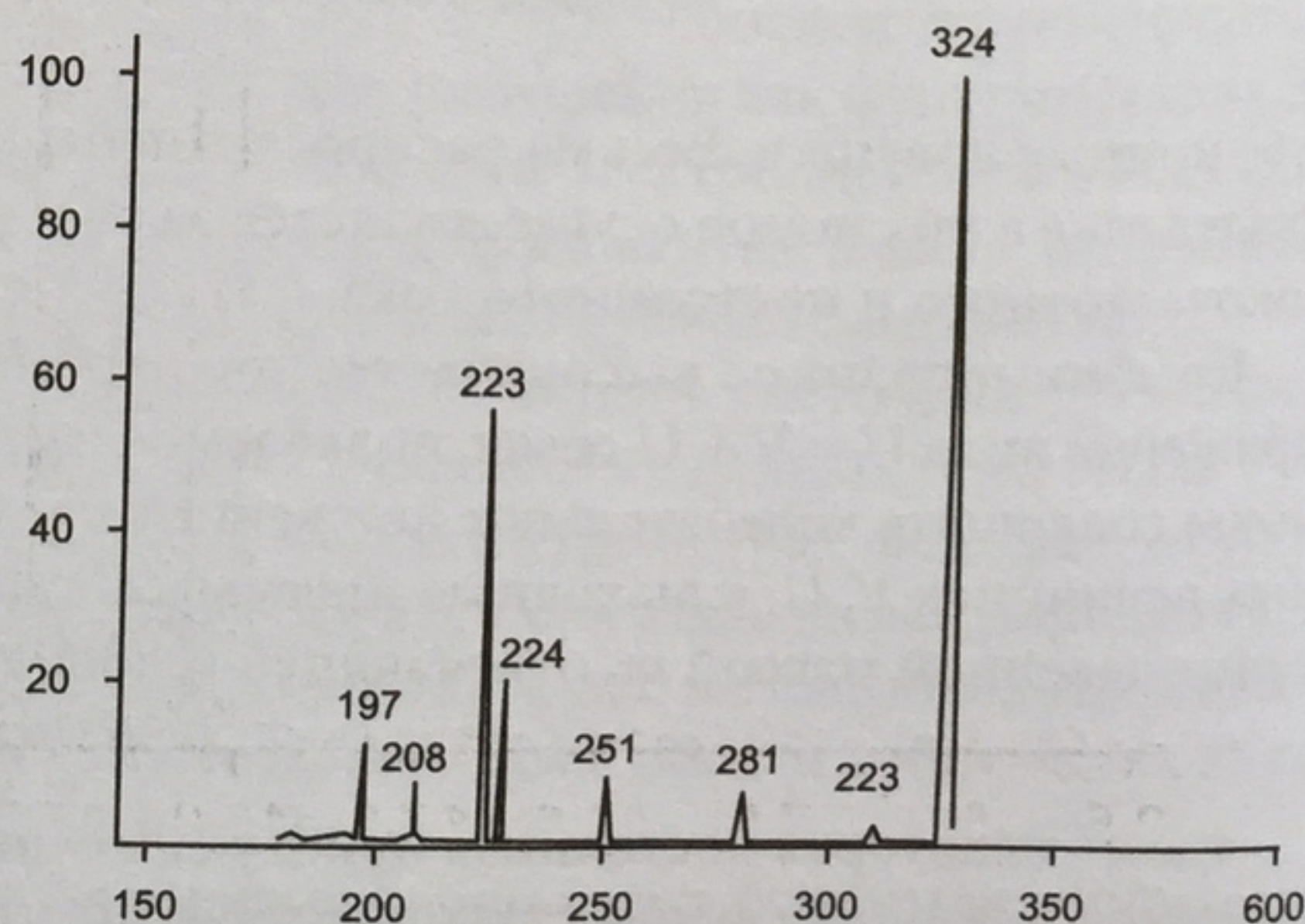


Схема 9.1

Рис. 9.15. Масс-спектр ЛСД, зарегистрированный в режиме электронного удара. Цифры на графике – величины m/z

В рамках этой книги нет возможности более подробно остановиться на вопросах устройства и применения хромато-масс-спектрометров – наиболее мощных из ныне существующих средств анализа органических веществ. Эти вопросы подробно рассмотрены в целом ряде руководств и монографий, из которых здесь могут быть упомянуты лишь несколько наиболее доступных читателям [96–100].

Следует подчеркнуть, что метод масс-спектрометрии в настоящее время широко применяют в сочетании не только с газовым, но и с жидкостным вариантом хроматографии, что еще более расширяет его огромные аналитические возможности.

Ниже приведены несколько показательных примеров применения этих мощных аналитических методов для определения лекарственных, наркотических и допинговых средств в образцах различной природы, которые, по нашему мнению, могут дать заинтересованному читателю представление об исключительно широких возможностях этого мощного химико-аналитического метода (рис. 9.15–9.24) [101–108]. Последний из этих примеров (рис. 9.24) показывает возможность прямой идентификации с помощью хромато-масс-спектрометрии активных компонентов в образцах наркотических средств, обращающихся в нелегальной продаже, что в ряде случаев дает возможность установить источники их поступления на рынок.

Большинство наркотических и допинговых средств имеют весьма характерные масс-спектры, позволяющие уверенно идентифицировать подлежащие контролю соединения. В качестве примера в табл. 9.2 приведены основные сигналы масс-спектров нескольких наркотиков, встречающихся достаточно часто. Сигналы m/z однозарядных ионов, образующихся при ионизации электронным ударом (энергия электронов 70 эВ), приведены в порядке убывания интенсивности. Обычно в этих спектрах наиболее интенсивен сигнал молекулярного иона, а также присутствуют сигналы ионов с массой на единицу большей и на единицу меньшей массы молекулярного иона. Первые образуются в результате протонирования исходной молекулы, а вторые – в результате отрыва протона.

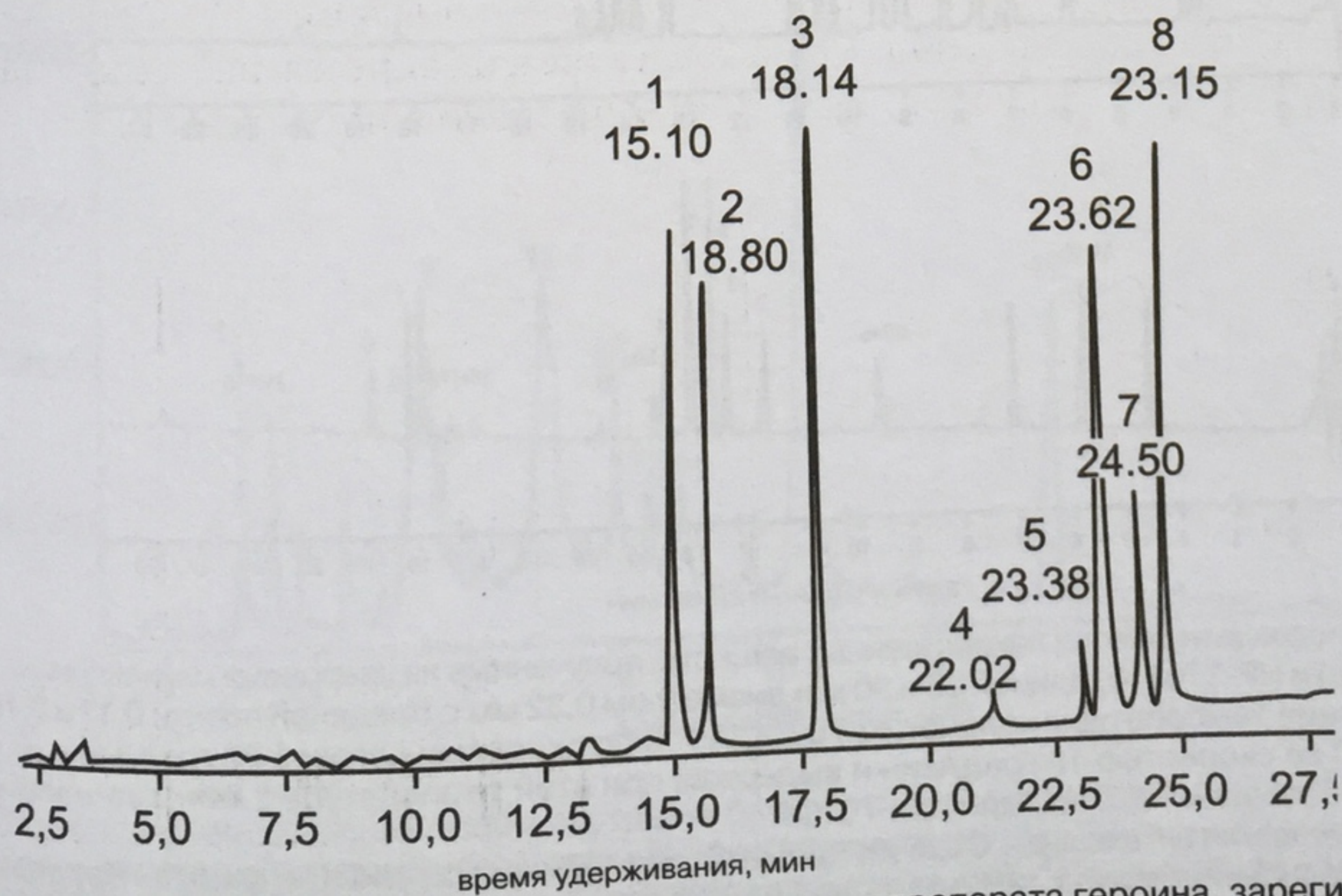


Рис. 9.16. Хроматограмма нелегально распространяемого препарата героина, зарегистрированная по полному ионному току масс-спектрометра: 1 – парацетамол; 2 – кофеин; 3 – дибазол; 4 – морфин; 5 – ацетилкодеин; 6 – моноацетилморфин; 7 – хлороквин; 8 – диацетилморфин (героин)

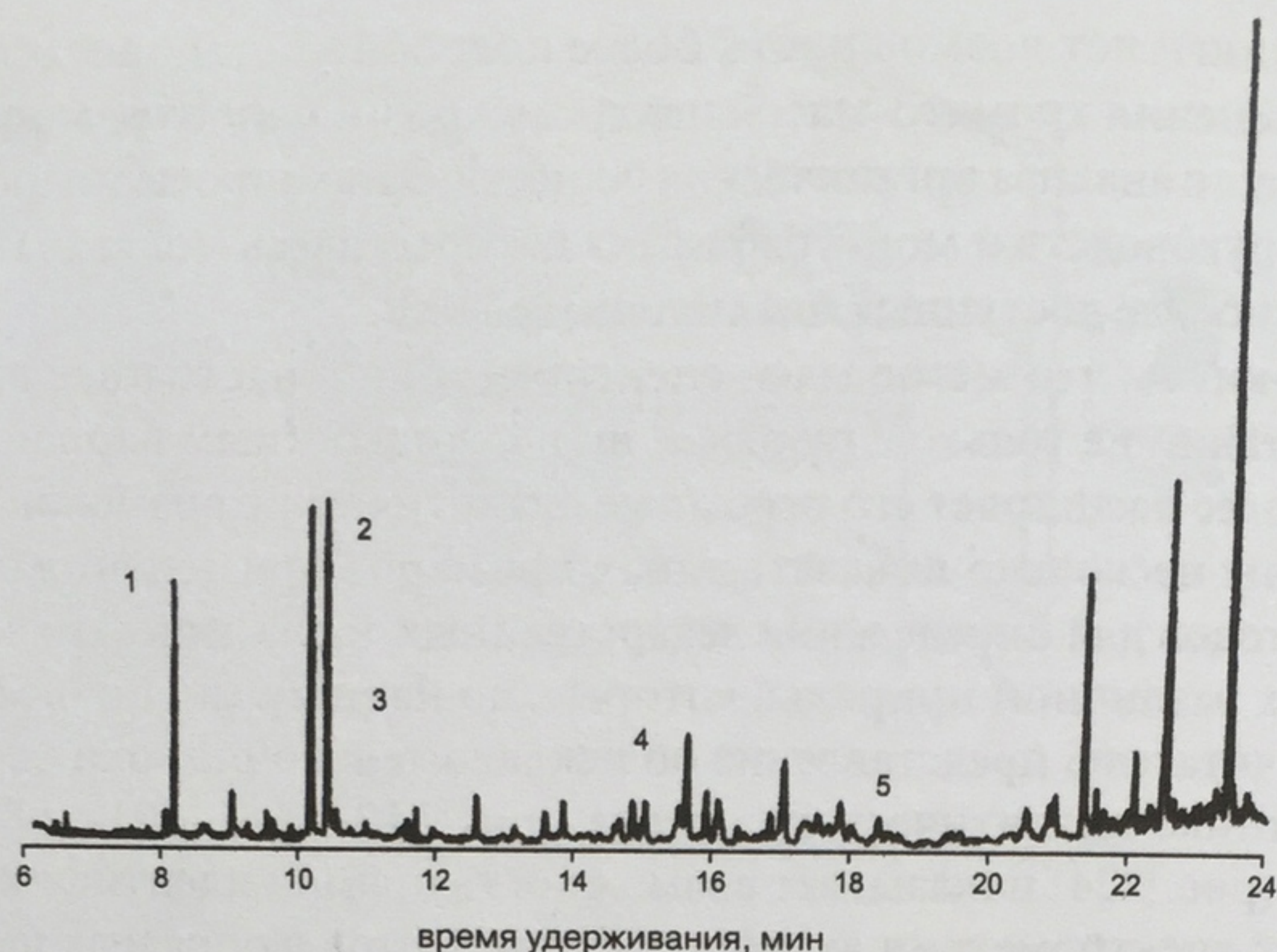


Рис. 9.17. Хроматограмма смеси компонентов экстракта табака, зарегистрированная по полному ионному току. Хроматограф HP-6890 с масс-селективным детектором РЗ-5973 (фирма «Хьюлетт-Паккард», США); кварцевая капиллярная колонка длиной 30 м с полисилоксановой неподвижной фазой DB-5ms (толщина пленки 0,25 мкм), температуру колонки изменяли по следующей программе: 40° С 1 мин; нагрев со скоростью 20 град/мин до 160° С; выдержка 1 мин; нагрев со скоростью 4 град/мин до 200° С; выдержка 1 мин; нагрев со скоростью 15 град/мин до 260° С; выдержка 21 мин. Газ-носитель – гелий со скоростью подачи 40 см/с. Обозначение пиков: 1 – тридейтероникотин; 2 – бипиридин; 3 – изомеры мегастигматриенона; 4 – кофеин; 5 – скополетин

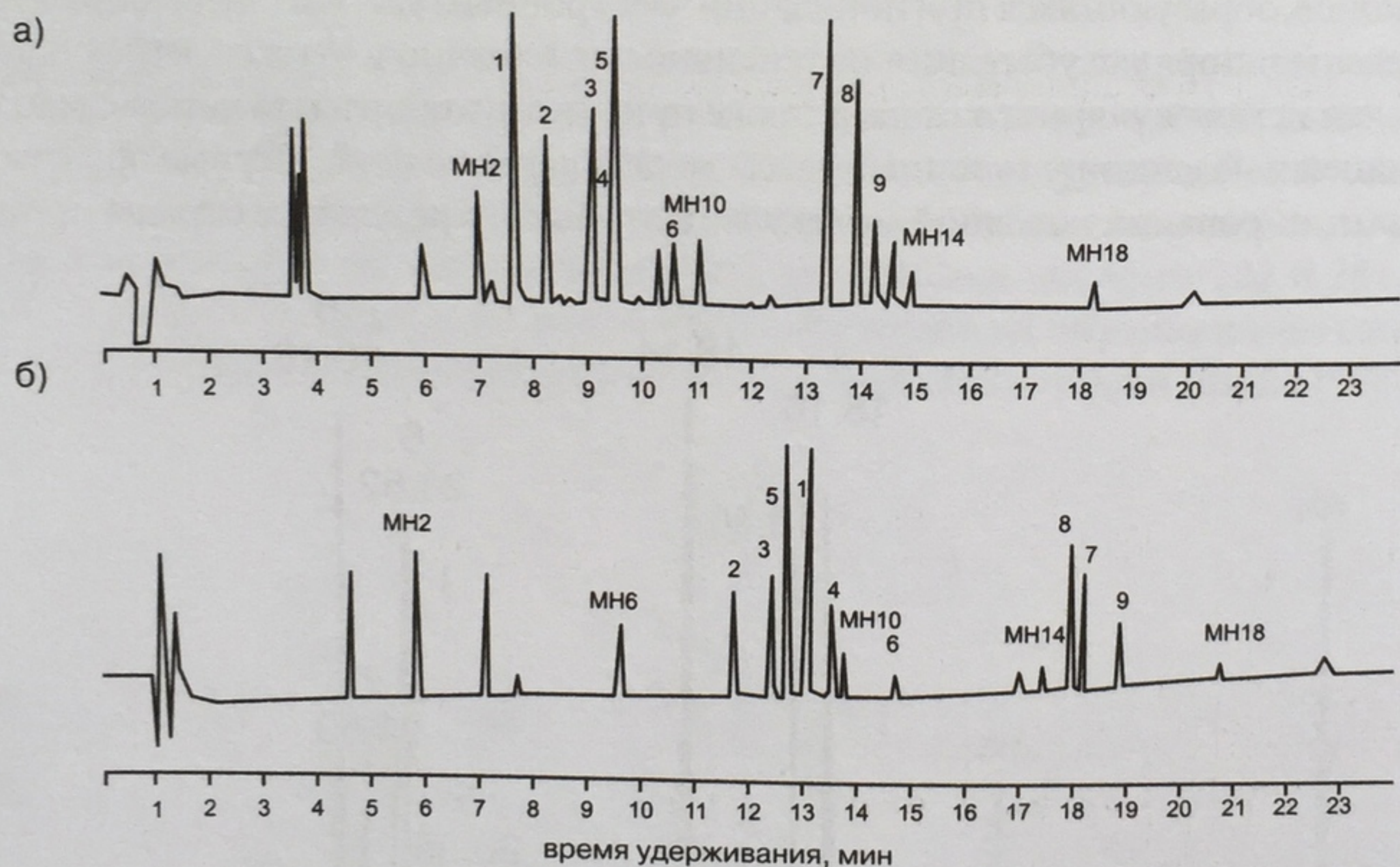


Рис. 9.18. Хроматограммы смесей лекарственных веществ, полученные на кварцевых капиллярных колонках Ultra 2(а) и HP-1701 (б) длиной 25 и 30 м и диаметром 0,32 мм с толщиной пленки 0,17 и 0,15 мм; программирование температуры колонок от 70 до 140° С со скоростью нагрева 20 град/мин, далее нагрев до 290° С со скоростью 10 град/мин и выдержка при этой температуре 8 мин; газ-носитель – гелий; скорость подачи – 2,5 мл/мин при 70° С.

а) хроматограф «Хьюлетт-Паккард», США, б) хроматограф «Микромат HRGC» (фирма «Нордион», Финляндия). Обозначение пиков: MH2–MH18 – серия 3-алкил-1-метилгидантоинов (стандартные соединения с алкильными группами от CH_3 до $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$); 1 – парацетамол; 2 – пентабарбитал; 3 – кофеин; 4 – феназон; 5 – гексабарбитал; 6 – фенобарбитал; 7 – хлomezанон; 8 – карбамазепин; 9 – фенитоин. Прочие пики не идентифицированы.

Рис. 9.19. Масс-фрагментация ацетильных производных наркоманов, отобранных по массе и времени задержки. Пик 2 – тридейтеро-6-ацетилморфин; пик 16 – диизопропиламфетамин; пик 100 – диизопропиламфетамин; пик 300 – диизопропиламфетамин.

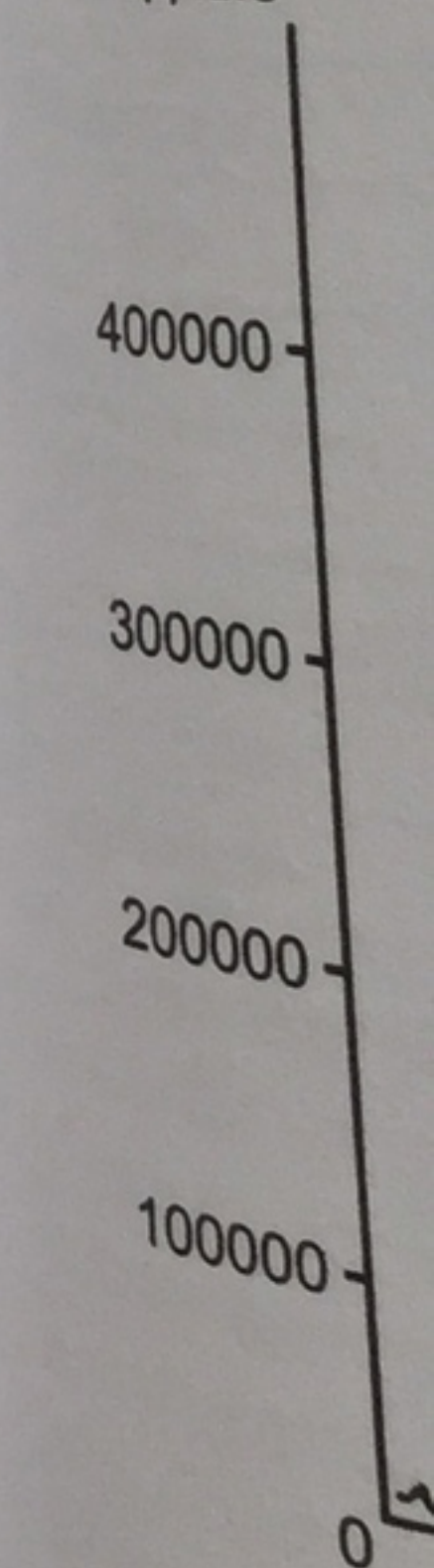


Рис. 9.20. Масс-фрагментация ионному току в загрязняющих веществах. Пик 6 – дибутилгидантоин; пик 16 – диизопропиламфетамин; пик 100 – диизопропиламфетамин; пик 300 – диизопропиламфетамин.

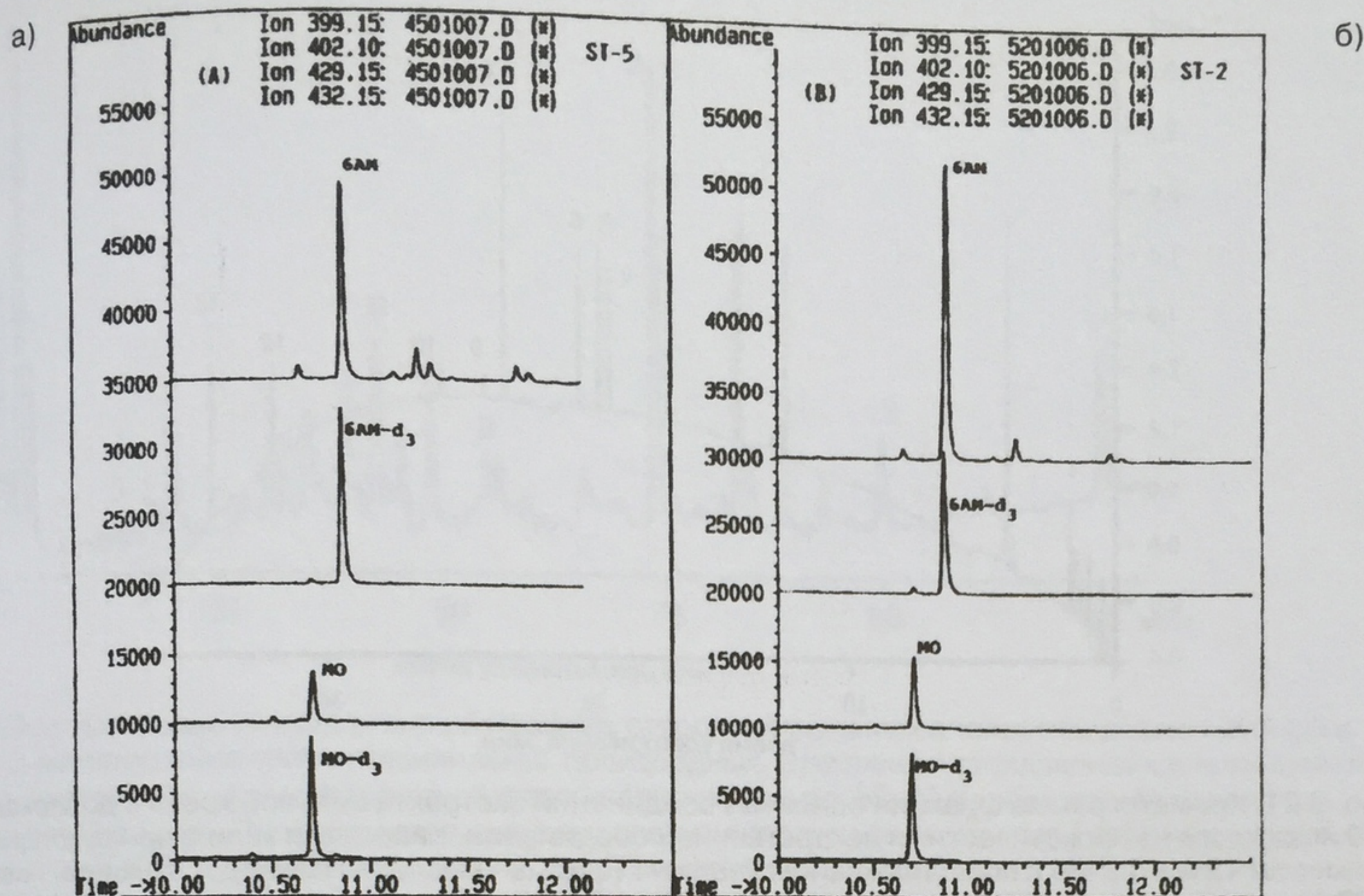


Рис. 9.19. Масс-фрагментограммы отдельных ионов морфина, его дейтерированных аналогов и ацетильных производных (триметилсилильные производные компонентов экстрактов проб волос наркоманов, отобранных на расстоянии 14–16 и 16–18 см от корней): 1 – 6-моноацетилморфин; 2 – тридейтеро-6-ацетил-морфин; 3 – морфин; 4 – тридейтероморфин. [106], а – морфин и детерированные аналоги и их ацетильные производные; б – соответствующие триметилсилильные производные

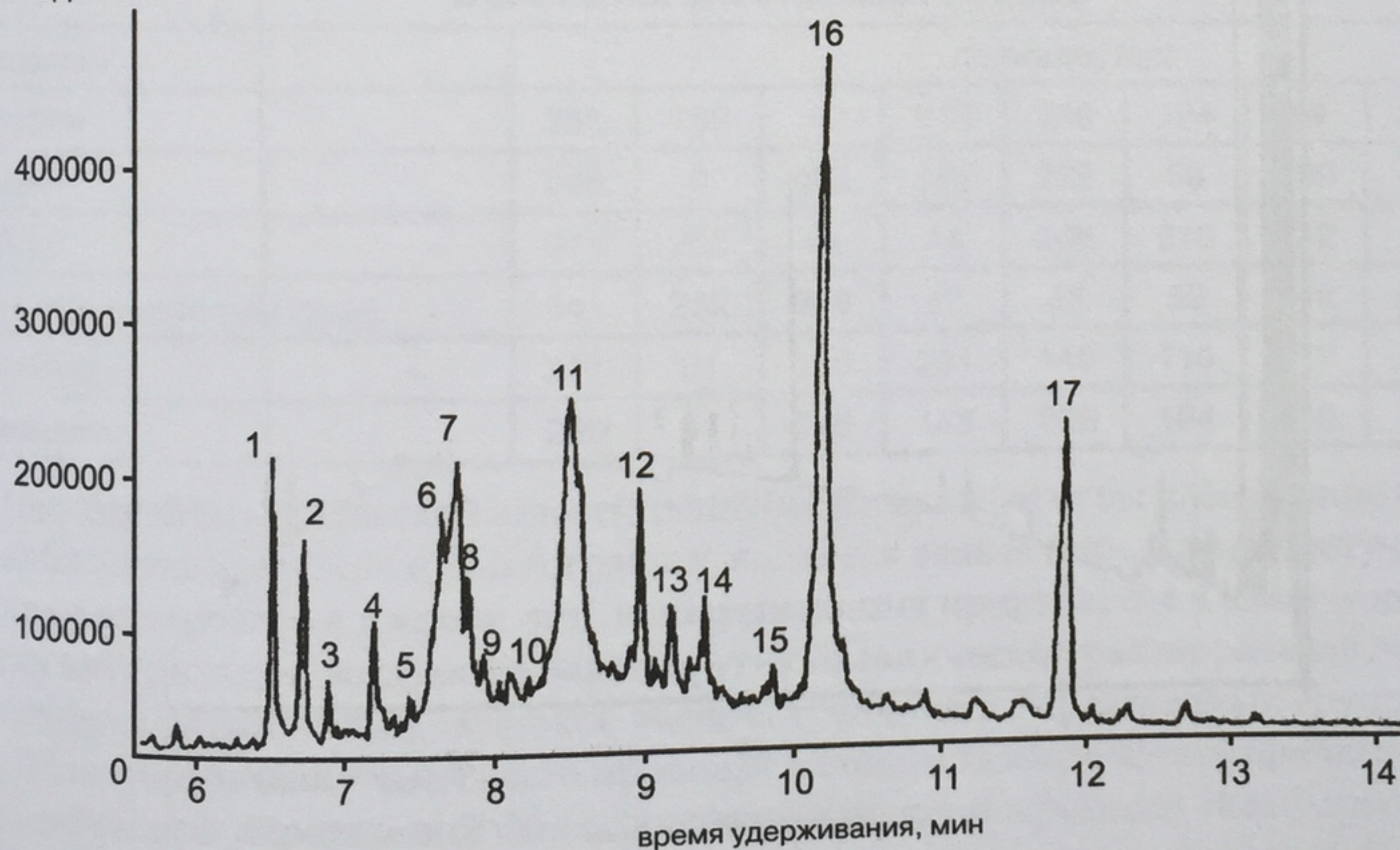


Рис. 9.20. Масс-хроматограмма пробы экстракта банкноты, зарегистрированная по полному ионному току в режиме электронного удара. Зарегистрировано более 17 пиков различных загрязняющих веществ. Среди них: пик 3 – изопропилмиридат; пик 5 – бензойная кислота; пик 6 – дибутилфталат; пик 7 – пальмитиновая кислота; пик 11 – олеиновая кислота; пик 12 – кокаин; пик 16 – диизооктилфталат. Кварцевая капиллярная колонка длиной 30 м и диаметром 0,25 мм с полисилоксаном DB-1 (толщина пленки 0,25 мкм), программирование температуры колонки от 100 до 300° С со скоростью нагрева 24 град/мин [107]

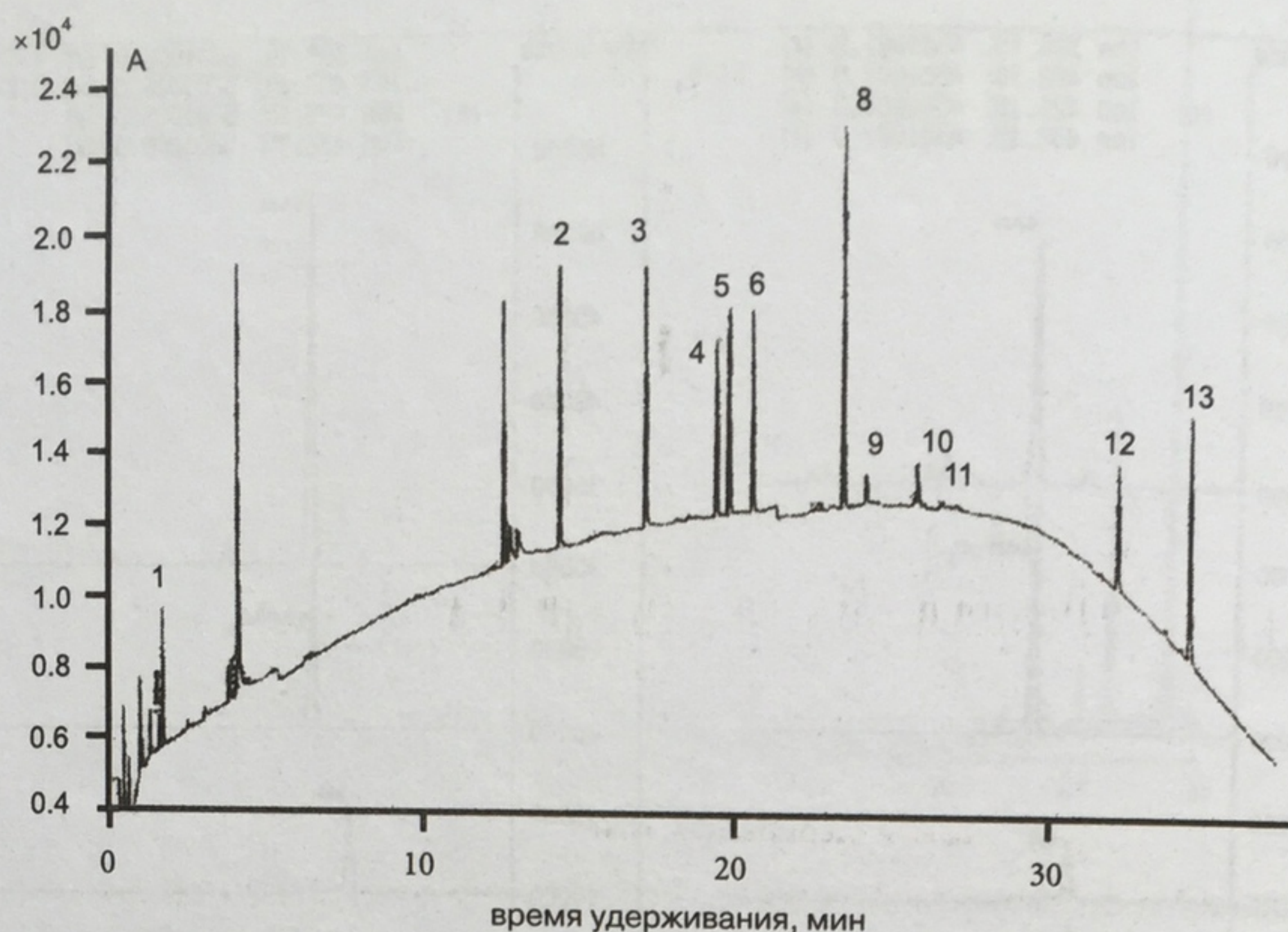


Рис. 9.21. Хроматограмма фракции основных соединений экстракта цельной крови с добавками 500 нг каждого из наркотических и лекарственных соединений. Кварцевая капиллярная колонка размером 12 м x 0,2 мм с полисилоксаном Ультра-1 (фирма «Хьюлетт-Паккард»), толщина пленки 0,33 мкм; программирование температуры от 100 до 280° С со скоростью нагрева 5 град./мин с выдержкой при 280° С 10 мин. Газ-носитель гелий, скорость потока 2 мл/мин; величина пробы 1 мкл, коэффициент деления потока 1:9; азотно-фосфорный термоионный детектор. Обозначение пиков: 1 – амфетамин; 2 – кофеина дифенгидрамин; 3 – прокаин (внутренний стандарт); 4 – метаквалон; 5 – метадон; 6 – кокаин; 8 – кодеин; 9 – морфин; 10 – 6-ацетилморфин; 11 – налорфин; 12 – галоперидол; 13 – стрихнин

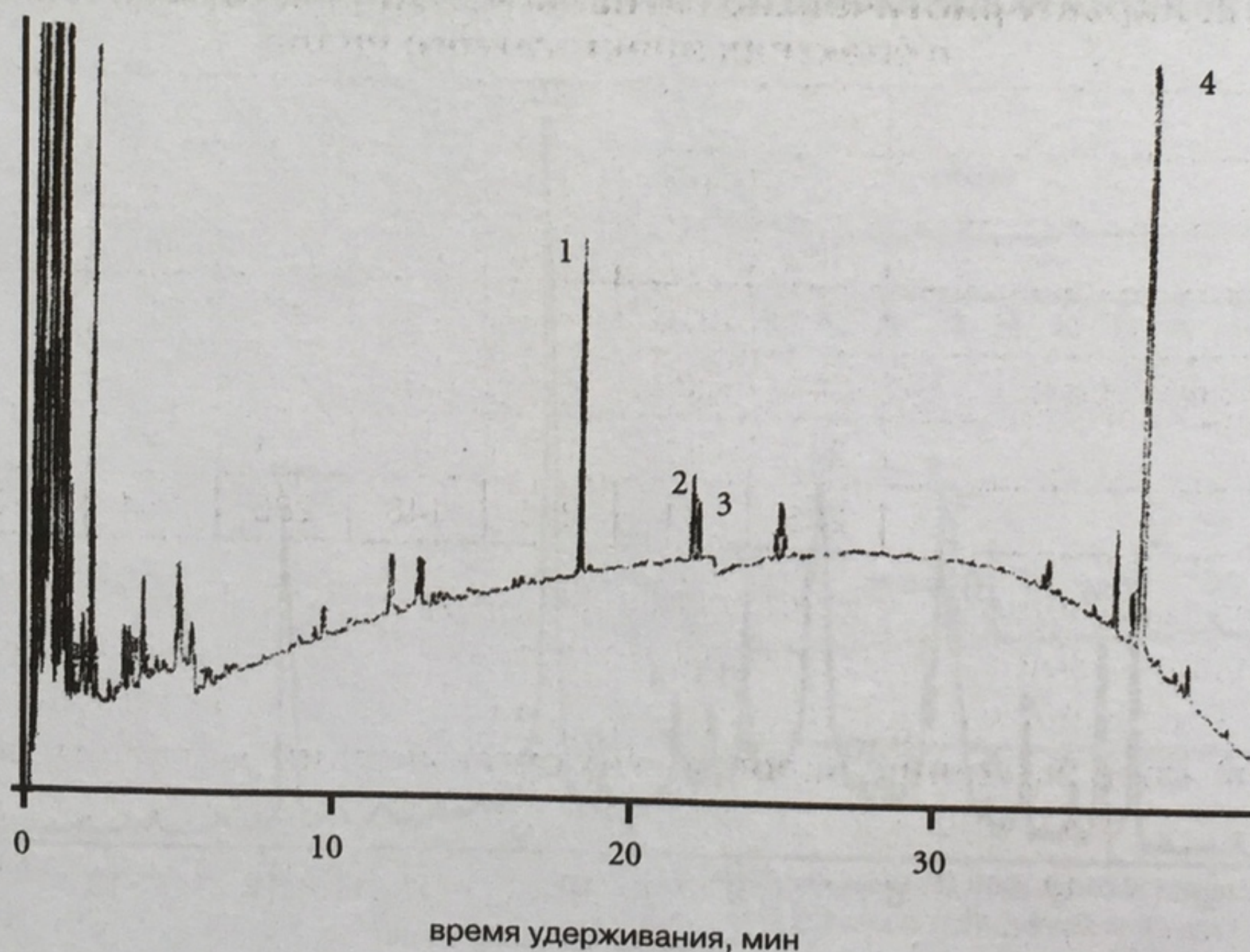


Рис. 9.22. Хроматограмма экстракта крови трупа человека, погибшего в результате самоубийства. Кварцевая капиллярная колонка размером 12 м x 0,2 мм с полисилоксаном Ультра-1 (фирма «Хьюлетт-Паккард»), толщина пленки 0,33 мкм; программирование температуры от 100 до 280° С со скоростью нагрева 5 град./мин с выдержкой при 280° С 10 мин. Газ-носитель гелий, скорость потока 2 мл/мин; величина пробы 1 мкл, коэффициент деления потока 1:9; азотно-фосфорный термоионный детектор. Обозначение пиков: 1 – прокаин (хроматографический внутренний стандарт); 2 – амитриптилин; 3 – нортриптилин; 4 – стрихнин. Компоненты 2 и 3 присутствуют в терапевтических концентрациях (0,1 мг/л), стрихнин – в летальной концентрации (6 мг/л)

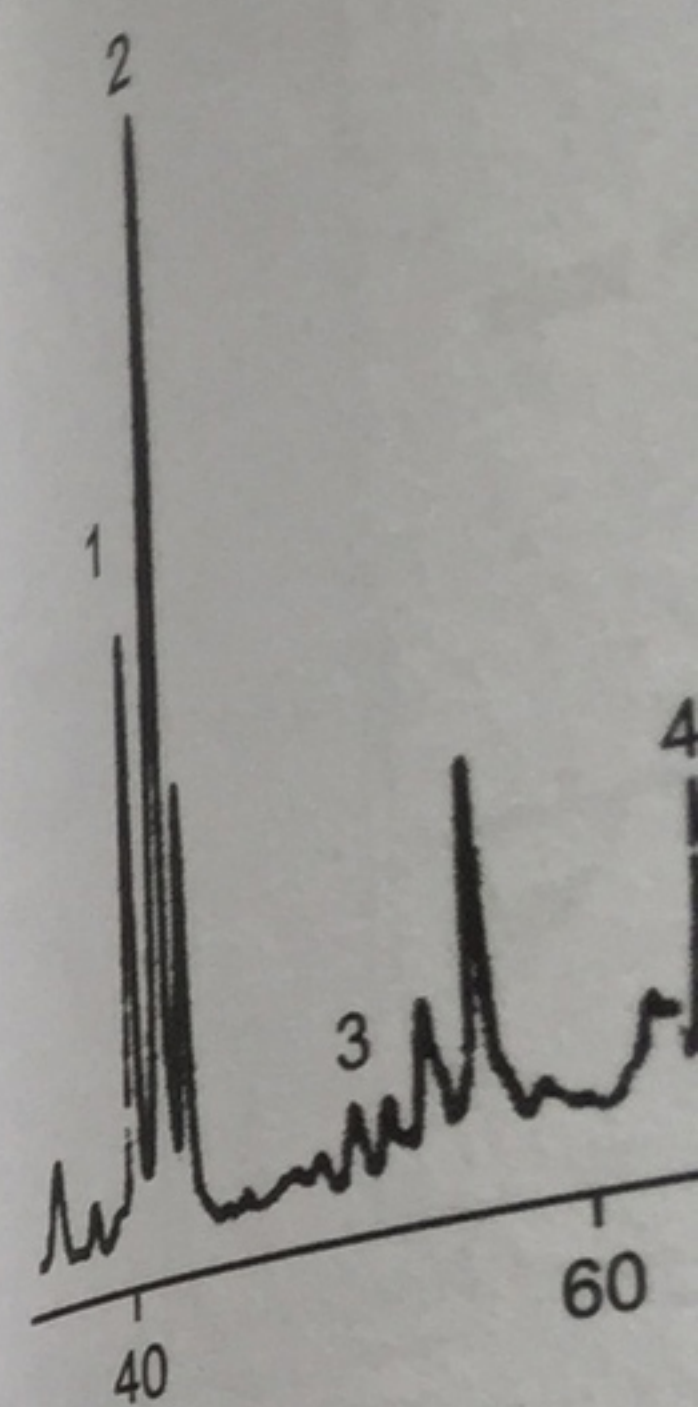


Рис. 9.23. Нормальный м... в форме О-метилоксимов. Колонка 60 м и диаметром 0,3 мм кремнезема Силанокс. Температура 200° С; иде... 2 – этиохоланон; 3 – дег... стерон; 6 – прегнандиол... 10 – тетрагидрокортисон... (5-прегнан-3, 11, 17, 20)

Таблица 9.2. Хар...

Вещества
Морфин
Кодеин
Тебаин
Героин (диацетилморфин)
Норморфин
Норкодеин

Последней ана... зования метода г... ческих растворит... емому внутрь, ил... в последнее врем... жи. Такие опреде... за равновесной... Для этой цели за... с пробами кров... хроматографич... матограф. Техн... графиях [110, ... рис. 9.25 и 9.26]

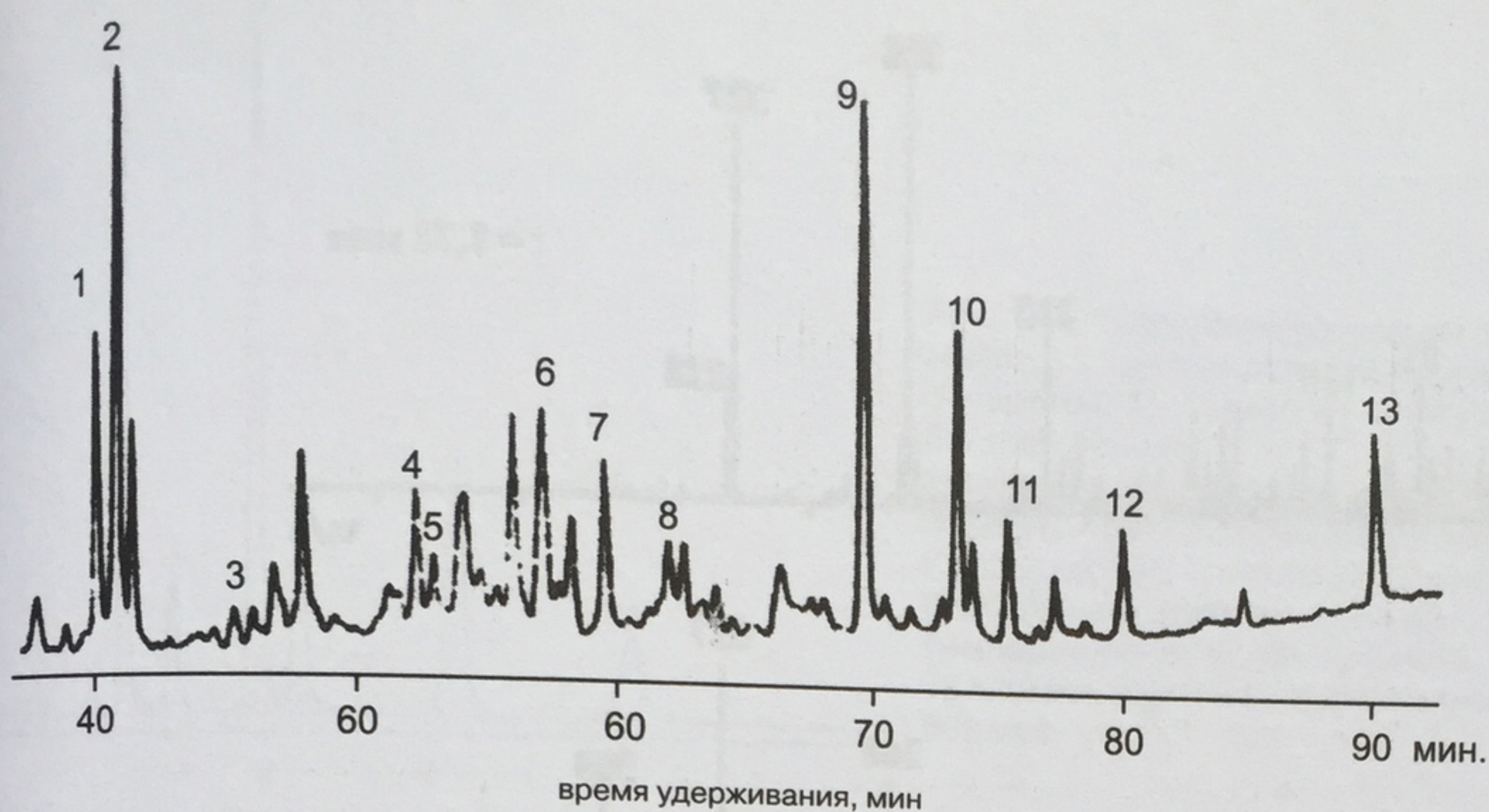


Рис. 9.23. Нормальный метаболический профиль стероидов организма человека, анализируемых в форме О-метилоксимов триметилсилильных производных. Стеклокапиллярная колонка длиной 60 м и диаметром 0,3 мм с неподвижной фазой полисилоксаном SE-30 с добавкой коллоидного кремнезема Силанокс. Программирование температуры колонки со скоростью 1 град/мин, начальная температура 200° С; идентифицировано более 30 компонентов. Среди них: 1 – андростерон; 2 – этиохоланон; 3 – дегидроэпиандростерон; 4 – 11-оксиандростерон; 5 – 16-оксидегидроэпиандростерон; 6 – прегнандиол; 7 – прегнантриол; 8 – 5-андростен-3,16,17-триол; 9 – тетрагидрокортизон; 10 – тетрагидрокортизол; 11 – кортолон (5-прегнан-3,17,20,21-тетраол-11-он); 12 – кортол (5-прегнан-3, 11, 17, 20, 21-пентол); 13 – бутиловый эфир холестерина (внутренний стандарт).

Таблица 9.2. Характеристические сигналы некоторых наркотических веществ в спектрах электронного удара

Вещества	Сигналы, m/z								
Морфин	285	162	42	215	286	124	44	284	268
Кодеин	286	2	162	124	229	59	300	69	
Тебаин	311	255	42	44	206	310	312	174	
Героин (диацетилморфин)	341	282	229	42	43	59	342	204	
Норморфин	271	81	150	201	148	110	272	82	
Норкодеин	285	81	215	148	286	164	110	115	

Последней аналитической задачей, решение которой было бы невозможно без использования метода газовой хроматографии, является задача определения летучих органических растворителей в крови лиц, испытывающих пристрастие к алкоголю, принимаемому внутрь, или к вдыханию паров других органических растворителей, что находит в последнее время весьма широкое распространение в определенных группах молодежи. Такие определения чаще всего проводят методом газохроматографического анализа равновесной парогазовой фазы (в английской транскрипции «head-space analysis»). Для этой цели заполненные примерно наполовину и герметически закрытые флаконы с пробами крови, подлежащими анализу термостатируют при 60–70° С и с помощью хроматографических пробоотборных устройств вводят пробы парогазовой фазы в хроматограф. Техника анализа равновесной парогазовой фазы подробно описана в монографиях [110, 111]. Примеры полученных таким образом хроматограмм приведены на рис. 9.25 и 9.26.

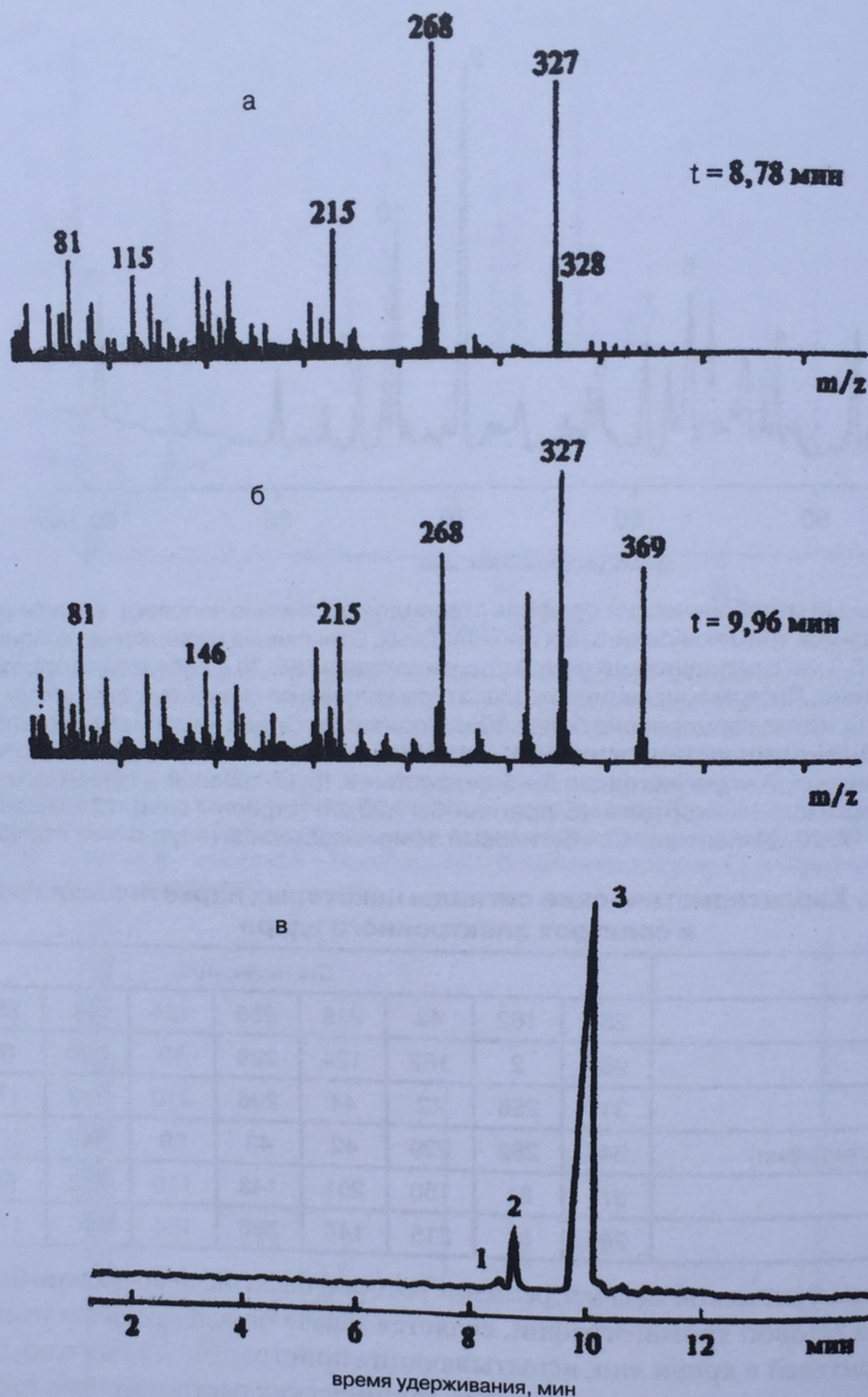


Рис. 9.24. Хроматограмма (а) и масс-спектры (б и в) «уличного» героина, распространяемого в нелегальной продаже:
 а – масс-спектр пика 2, идентифицированного как моноацетилморфин;
 б – масс-спектр пика 3, идентифицированного как диацетилморфин (героин),
 пик 1 – ацетилкодеин, обычная примесь героина, распространяемого в нелегальной продаже
 в – хроматограмма, полученная на хроматографе HP-5890 с масс-селективным детектором HP-5971 и с кварцевой капиллярной колонкой длиной 12 м и диаметром 0,2 мм с полисилоксановой неподвижной фазой HP-1 с толщиной пленки 0,33 мкм, (фирма «Хьюлетт-Паккард», США); газ-носитель гелий; объем пробы 1 мкл; программирование температуры колонки от 150° С (1 мин) до 250° С со скоростью нагрева 20 град/мин, далее выдержка 5 мин и дальнейший нагрев до 300° С со скоростью 5 град/мин. Масс-спектры зарегистрированы в режиме электронного удара при энергии электронов 70 эВ;

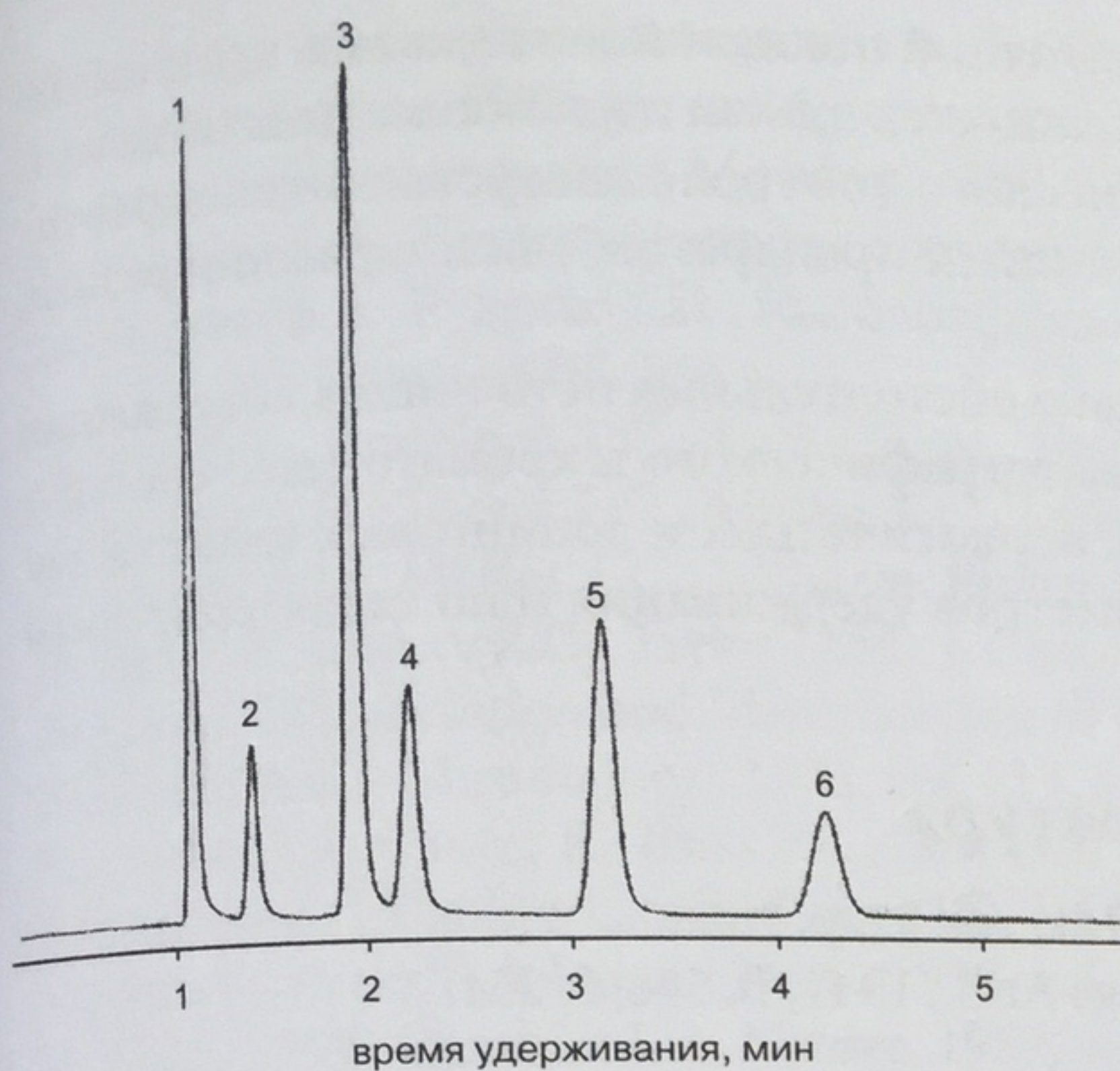


Рис. 9.25. Определение следов алкоголя в крови: 1 – ацетальдегид; 2 – метанол; 3 – ацетон; 4 – этанол; 5 – изопропанол 6 – трет.бутанол.

Кварцевая колонка размером 180x0,3 см, сорбент – 5% полиэтиленгликоля Карбовакс20М на углеродном носителе КарбоБлэк Б, размер зерна 80–120 меш; температура 90° С; газ-носитель – гелий, 18 мл/мин; величина парообразной пробы – 500 мкл

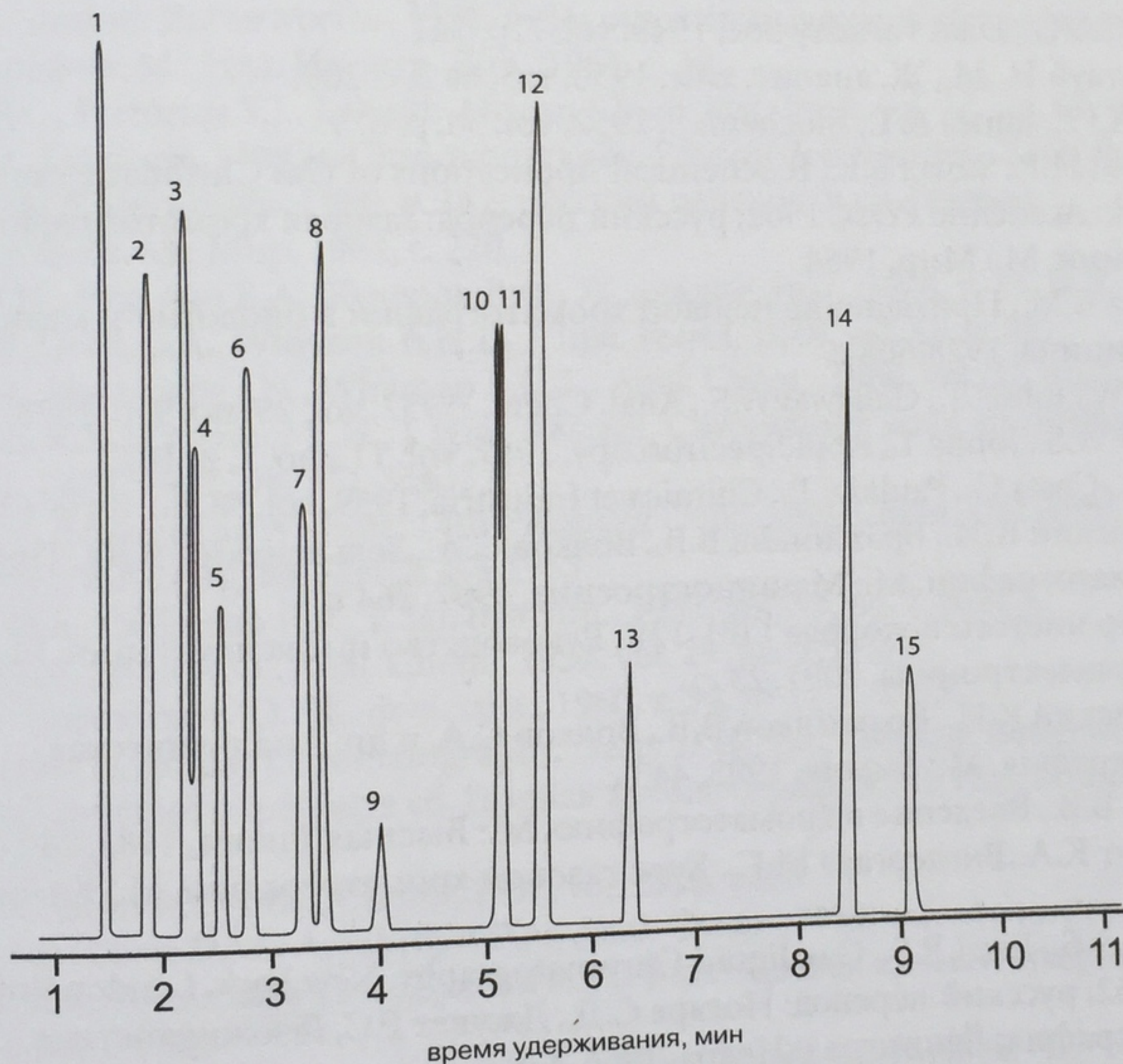


Рис. 9.26. Хроматограмма смеси органических растворителей, используемых для вдыхания лицами, страдающими токсикоманией: 1 – метанол; 2 – этанол; 3 – диэтиловый эфир; 4 – изопропанол; 5 – хлористый метилен; 6 – ацетон; 7 – трет. бутилметилэтиловый эфир; 8 – гексан; 9 – хлороформ; 10 – этил-ацетат; 11 – метилэтилкетон; 12 – бензол; 13 – трихлорэтилен; 14 – толуол; 15 – изобутилметилкетон. Кварцевая капиллярная колонка длиной 30 м и диаметром 0,32 мм с неподвижной фазой RtxBACI (фирма «Рестек», США); программирование температуры от 40 до 120°С со скоростью нагрева 10 град/мин; газ-носитель гелий, линейная скорость 50 см/с, величина парообразной пробы 250 мкл; пламенно-ионизационный детектор.

Все приведенные выше примеры с достаточной полнотой показывают, что в настоящее время метод газовой хроматографии является одним из наиболее действенных и результативных методов химико-аналитического контроля лекарственных, наркотических и допинговых веществ как в виде чистых препаратов, так и в разнообразных биологических объектах.

В заключение этой главы укажем несколько обстоятельных источников, содержащих обширные данные как по технике газохроматографического и хромато-масс-спектрометрического определения лекарственных, наркотических и допинговых веществ, так и по величинам хроматографических параметров удерживания и по характеристикам их масс-спектров [112-121)].

Литература

1. Martin A.J.P., Singe R.L.M., Biochem. J., 1941, vol. 35, p. 1358.
2. Hesse G., Eilbracht Y., Reicheneder F., Liebigs Ann., 1941, B. 546, S. 251.
3. Wicke E., Angew. Chem., 1947, B. 19, S. 345.
4. Cremer E., Prior F., Z. Electro chem., 1951, vol. 55, pp. 56, 217.
5. Phillips C.S.G., Disc. Faraday Soc, 1949, vol. 7, p. 241.
6. Туркельтауб Н., М., Ж. аналит. хим. 1950, т. 5, № 2, с. 200.
7. Martin A.J.P., James A.T., Biochem. J., 1952, vol. 50, p. 679.
8. Burchfield H.P., Storrs E.E., Biochemical Applications of Gas Chromatography, New York: Academic Press, 1962; русский перевод: Газовая хроматография в биохимии, М.: Мир, 1964.
9. Митрука Б.М., Применение газовой хроматографии в биологии и медицине, М.: Медицина, 1978, 608 с.
10. Donner W., Johns T., Gallaway W.S., Anal. Chem., 1957, vol. 29, no. 9, p. 1378.
11. Gallaway W.S., Johns T., Appl. Spectroscopy, 1957, vol. 11., no. 2, p. 102.
12. Liberti A., Costa G., Paulazzi E., Chimica et Industria, 1959, vol. 38, no. 8, pp. 674-677.
13. Сакодынский К.И., Бражников В.В., Волков С.А., Зельвенский В.Ю., Приборы для хроматографии, М.: Машиностроение, 1987, 264 с.
14. Генератор чистого водорода ГВЧ-12К. Руководство по эксплуатации, М.: НЛП Химэлектроника, 2001, 23 с.
15. Сакодынский К.И., Бражников В.В., Волков С.А. и др. Аналитическая хроматография, М.: Химия, 1993, 443 с.
16. Айвазов Б.В., Введение в хроматографию, М.: Высшая школа, 1983, 240 с.
17. Гольдберт К.А., Вигдергауз М.С., Курс газовой хроматографии, М.: Химия, 1974, 375 с.
18. Dal Nogare S., Juvet R.S., Gas-liquid Chromatography, New York, London: Interscience Publ., 1962; русский перевод: Ногаре С.Д., Джувет Р.С., Газожидкостная хроматография, Ленинград: Недра, 1966, 470 с.
19. McNair H.M., Bonelli E.J., Basic Gas Chromatography, Oakland, CA: Consol. Print., 1967; русский перевод: Введение в газовую хроматографию, М.: Мир, 1970, 277 с.
20. Литвинов Л.Д., Руденко Б.А., Газовая хроматография в биологии и медицине, М.: Медицина, 1971, 224 с.
21. Supina W., The Packed Columns in Gas Chromatography, Bellefonte, PA: Supelco Inc., 1974; русский перевод: Насадочные колонки в газовой хроматографии, М.: Мир, 1977, 256 с.

22. Jennings W., Gas Chromatography with Glass Capillary Columns, New York et al.: Academic Press, 1978; русский перевод: Газовая хроматография на стеклянных капиллярных колонках, М.: Мир, 1980, 232 с.
23. Руденко Б.А., Капиллярная хроматография, М.: Наука, 1978, 215 с.
24. Руденко Б.А., Руденко Г.И., Высокоэффективные хроматографические процессы, т. 1, 2, М.: Наука, 2003, 426 с.
25. Kazyak L., Knoblock T.C., Anal. Chem., 1963, vol. 35, p. 1448.
26. Beckett A.H., Tucker G.T., Moffat A.C., J. Pharm. Pharmacol., 1967, vol. 19, p. 273.
27. Beckett A.H., Moffat A.C., J. Pharm. Pharmacol., 1968, vol. 20, Suppl, p. 48S.
28. Finkle B., Cherry E.G., Taylor D.M., J. Chromatogr. Sci., 1971, vol. 9, p. 393.
29. Clarke E.G., Isolation and Identification of Drugs, London: Pharmaceutical Press, 1969.
30. Moffat A.C. J. Chromatogr., 1975, vol. 113, no. 1, pp. 69-95.
31. Cooper J.A., Cauter R., Estes F.L., Gast G.H., J. Chromatogr., 1960, vol. 3, no. 1, p. 87.
32. Littlewood C, Phillips C.S.G., Price D.T., J. Chem. Soc, 1955, p. 1480.
33. Gato R., Araki T., J. Japan Chem., 1958, vol. 12, no. 11, p. 826.
34. Scott R.P.W., Cheshire J.D., Nature, 1957, vol. 180, no. 4588, p. 702.
35. Golay M.J.E., In: Gas Chromatography. Proc. of the 2nd Sympos. in Amsterdam, Desty D.H., Ed., London: Butterworths, 1958, p. 36; русский перевод: в сб. Газовая хроматография, М.: Изд. Иностран. Лит., 1961, с. 39.
36. Haarhof P.C., Pretorius V.J., J. South African Chem. inst, 1960, vol. 18, no. 97, p. 116.
37. Desty D.H., Goldup A.) In: Gas Chromatography, Proc. of 3rd Sympos., Scott R.P.W. Ed., London: Butterworths, 1960, p. 162; русский перевод: в сб. Газовая хроматография, М.: Мир, 1964, с. 220.
38. Пауков В.Н., Руденко Б.А., Кучеров В.Ф., Ж. аналит. хим., 1968, т. 23, № 8, с. 1247.
39. Desty D.H., Goldup A., Whyman B.H.L., J. Inst. Petrol, 1959, vol. 45, p. 287.
40. Desty D.H., Haresnape J.N., Whyman B.H.L., Anal. Chem., 1960, vol. 32, no. 1, p. 302.
41. Dandeneau R.D., Zerenner E.H., J. High Resolut. Chromatogr. and Chromatogr. Commun., 1979, vol. 2, pp. 351-356.
42. Jentzsch D., Hovermann W., Proc. 14th Pittsburg Conf. Anal. Chem. and Appl. Spectroscopy, Pittsburg, Pa: March 4-8, 1963.
43. Ambrose D.A., Collerson R.R., J. Sci. Instrum., 1955, vol. 32, no. 1, p. 323.
44. Brouning L.C., Watts J.O., Anal. Chem., 1957, vol. 29, no. 1, p. 24.
45. Фейш П., Энгельгарт Ю., Ж. физ. хим., 1960, т. 34, № 12, с. 2355.
46. Van de Craats F., In: Gas Chromatography, Desty D.H., Ed., London: Butterworths, 1958, p. 262; русский перевод: в сб. Газовая хроматография, М.: Изд. Иностран. Лит., 1961, с. 232.
47. Rosie D.M., Grob R.L., Anal. Chem., 1957, vol. 29, p. 1263.
48. Messner A.E., Rosie D.M., Argabright P.A., Anal. Chem., 1959, vol. 31, no. 2, p. 230.
49. Иогансен А.В., Кудрявцев И.А., Дулова Н.И., В сб.: Газовая хроматография, М.: ГосИНТИ, 1961, с. 32.
50. Hinkle E.A., Johnson S.E., In: Gas Chromatography, Coates V.J., Noebels H.J., Fagerson J.S., Eds., New York: Academic Press, 1958, p. 25.
51. Littlewood A.B., Nature, 1959, vol. 184, p. 1631.
52. Mecke R., Zirker K., J. Chromatogr., 1962, vol. 7, p. 1.
53. Green G.T., Nature, 1957, vol. 180, no. 4580, p. 295.
54. Stuve W., In: Gas Chromatography, Desty D.H., Ed., London: Butterworths, 1958, p. 178; русский перевод: Газовая хроматография, М.: Изд. Иностран. Лит., 1981, с. 168.

55. Norem S.D., In: Gas Chromatography, Coates V.J., Noebels H.J., Fagerson J.S., Eds., New York: Academic Press, 1958, p. 141.
56. Zlatkis A., Ridgeway J.A., Nature, 1958, vol. 182, p. 130.
57. Руденко Б.А., Кучеров В.Ф., Известия АН СССР, Отд. хим. наук, 1963, с. 220.
58. Каганов И.Л., Ионные приборы, М.: Энергия, 1972, 526 с.
59. Yamana M., J. Chromatogr., 1962, vol. 9, no. 1, p. 162; 1963, vol. 11, no. 1, p. 158.
60. Karmen A., Bowman R.L., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 1959, vol. 41, p. 753.
61. Миронов А.С., Авт. свид. СССР № 160032; Бюлл. изобр. 1964, № 2, с. 67.
62. Lovelock J.E., Nature, 1958, vol. 182, p. 1663.
63. Озиранер С.Н., Газиев Г.А., Яновский М.И., Корпяков В.С., В кн.: Газовая хроматография. Труды I Всесоюзн. Конф., М.: Изд. АН СССР, 1960, с. 199.
64. Lovelock I.E., James A.T., Piper E.A., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1959, vol. 72, p. 720.
65. Condon R.D., Scholly P., Averill W.A., In: Gas Chromatography, Scott R.P.W., Ed., London: Butterworths, 1960, pp. 31, 199; русский перевод: Газовая хроматография, М.: Мир, 1964, с. 45.
66. Simmons M.S., Richardson D.R., Dvoretzky I., In: Gas Chromatography, Scott R.P.W., Ed., London: Butterworths, 1960, p. 211; русский перевод: Газовая хроматография, М.: Мир, 1964, с. 283.
67. Otvos J.M., Stivenson D.P., J. Amer. Chem. Soc., 1956, vol. 78, p. 541.
68. Harley J., Nel W., Pretorius V., Nature, 1958, vol. 181, no. 4603, p. 177.
69. McWilliam I.G., Dewar R.A., Nature, 1958, vol. 181, no. 4611, p. 760.
70. Калмановский В.И., Фикс М.М., Яшин Я.И., В сб.: Автоматические газоанализаторы, ЦИТИ Электропром, 1961, с. 473.
71. McWilliam J.E., J. Appl. Chem., 1959, vol. 9, p. 379.
72. Brenner N., Ettre L.S., Acta Chim. Sci. Hung., 1961, vol. 27, p. 205.
73. Hallis O.L., Hayes W.V., Anal. Chem., 1962, vol. 34, p. 1216.
74. Ettre L.S., J. Chromatogr., 1963, vol. 11, no. 1, p. 114.
75. Ongkiehong L., In: Gas Chromatography, Scott R.P.W., Ed., London: Butterworths, 1960, p. 7; русский перевод: Газовая хроматография, М.: Мир, 1964, с. 15.
76. Giuffrida L., Iwes F., J. Ass. Offic. Agric. Chemists, 1964, vol. 47, no. 6, p. 1112.
77. Lovelock J.E., Lipsky S.R., J. Amer. Chem. Soc., 1960, vol. 82, p. 431.
78. Goodwin E.S., Goulden R., Richardson A., Reynolds J.C., Chem. Ind., 1960, p. 1220.
79. Adloff J.P., Guegulniat P., J. Chromatogr., 1963, vol. 12, p. 96.
80. Rails J.W., Cortes A., J. Gas Chromatogr., 1964, vol. 2, no. 4, p. 132.
81. Reinolds H.L., J. Gas Chromatogr., 1964, vol. 2, no. 7, p. 219.
82. Bayer E., Reuther K.H., Born F., Angew. Chem. 1957, Bd. 69, H. 20, S. 640.
83. Piringer O., Pascalau M., J. Chromatogr., 1962, vol. 8, no. 3, p. 410.
84. Dijkstra A., Fabric C.C., Kateman G., et al., J. Gas. Chromatogr., 1964, vol. 2, no. 6, p. 180.
85. Leipnitz W., Mohnke M., Chem. Techn., 1962, vol. 14, no. 12, pp. 753-754.
86. Бражников В.В., Дифференциальные детекторы для газовой хроматографии, М.: Наука, 1974, 223 с.
87. Бражников В.В., Детекторы для хроматографии, М.: Машиностроение, 1992, 317 с.
88. Handbuch der Gaschromatographie, Leibnitz E., Struppe H.-G., Eds., T. 1, 2, Leipzig: Geest und Porting, 1984; русский перевод: Руководство по газовой хроматографии, ч. 1, 2, М.: Мир, 1988.
89. Андреев Л.В., Афанасьев М.Н., Чаброва О.Г., Вигдергауз М.С., Успехи химии, 1965, т. 34, № 5, с. 920-967.

90. Жуховицкий А.А., Ян с. 21-24.
91. Pettitt B.C., J. High Re no. 1, pp. 45-47.
92. Проспект фирмы R PA: Restek Corp., 20
93. Ленчик Н.В., Руден
94. Байдаровцева М.А. природных соедин
95. Фицев И.М., Будни № 8, с. 847-854.
96. Blaschke G., Kraft H S. 1690.
97. Blaschke G., Kraft I
98. Guiochon G., Guill Elsevier, 1988; русс газовая хроматог
99. Заикин В.Г., Варл спектрометрии о Интерпериодика
100. Karasek F.W., Kle Amsterdam: Elsev М.: Мир, 1993, 2
101. Еремин С.К., Из М.: Мысль, 1993
102. Зенкевич И.Г., I соединений, Ле
103. Webb K., VAM I
104. Song (Sherry) S
105. Rasanen I., Ojar
106. Nakahara Y., Ki
107. Song D.-M., Zh
108. Zweipfenning J. Chromatogr
109. Pfaffenberger
110. Hachenberg H Heyden, 1977 паровой фаз
111. Витенберг А Ленинград:

90. Жуховицкий А.А., Яновский СМ., Силаева И.А., и др., Заводск. лаборат. 1981, № 5, с. 21-24.
91. Pettitt B.C., J. High Resolut. Chromatogr. and Chromatogr. Commun., 1982, vol. 5, no. 1, pp. 45-47.
92. Проспект фирмы Restek (USA): Chromatography Products 2003, Bellefonte, PA: Restek Corp., 2003.
93. Ленчик Н.В., Руденко Б.А., Фармация, 1986, т. 35, № 5, с. 33-37.
94. Байдаровцева М.А., Руденко Б.А., Кулешова М.И., Кучеров В.Ф., Химия природных соединений, 1975, № 6, с. 739-746.
95. Фицев И.М., Будников Т.К., Блохин В.К., Тесленко П.Г., Ж. аналит. хим., 2003, т. 58, № 8, с. 847-854.
96. Blaschke G., Kraft H.-P., Finkentscher K., Koehlr F., Arzneim-Forsch, 1979, Bd. 29, S. 1690.
97. Blaschke G., Kraft H.-P., Markgraf H., Chem. Ber., 1980, Bd. 113, S. 2318.
98. Guiochon G., Guillemin C.L., Quantitative Gas Chromatography, Amsterdam et al.: Elsevier, 1988; русский перевод: Гиошон Ж., Гийемен М.И., Количественная газовая хроматография, ч. 1, 2, М.: Мир, 1991.
99. Заикин В.Г., Варламов А.В., Микая А.И., Простаков Н.С., Основы масс-спектрометрии органических соединений, М.: МАИК Наука/Интерпериодика, 2001, 286 с.
100. Karasek F.W., Klement R.E., Basic Gas Chromatography - Mass Spectrometry, Amsterdam: Elsevier, 1988; русский перевод: Введение в хромато-масс-спектрометрию, М.: Мир, 1993, 236 с.
101. Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В., Анализ наркотических средств, М.: Мысль, 1993, 269 с.
102. Зенкевич И.Г., Иоффе Б.В., Интерпретация масс-спектров органических соединений, Ленинград: Химия, 1986,
103. Webb K., VAM Bulletin, 1996, no. 15, pp. 15-17.
104. Song (Sherry) S., Ashley D.L., J. Chromatogr. A, 1998, vol. 814, pp. 171-180.
105. Rasanen I., Ojanpera L., Vuori E., Hase T.A., J. Chromatogr. A, 1996, vol. 738, pp. 233-239.
106. Nakahara Y., Kikura R., Takahashi K., J. Chromatogr. B., 1994, vol. 657, pp. 93-101.
107. Song D.-M., Zhang Sh., Kohlhof K., J. Chromatogr. A, 1996, vol. 731, pp. 355-360.
108. Zweipfenning P.G.M., Wilderink A.H.C.M., Horsthuis P., Franke J.-P., de Zeeuw R.A., J. Chromatogr. A, 1994, vol. 674, pp. 87-95.
109. Pfaffenberger C.D., Horning E.C., J. Chromatogr., 1975, vol. 112, pp. 581-587.
110. Hachenberg H., Schmidt A.P., Gas Chromatographic Headspace Analysis, London et al.: Heyden, 1977; русский перевод: Газохроматографический анализ равновесной паровой фазы, М.: Мир, 1979, 160 с.
111. Витенберг А.Г., Иоффе Б.В., Газовая экстракция в хроматографическом анализе, Ленинград: Химия, 1982, 279 с.

ГЛАВА 10

КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Последний метод, который должен быть рассмотрен при обсуждении высокоэффективных процессов анализа наркотических и допинговых веществ – это капиллярный электрофорез.

Этот метод анализа и разделения веществ вошел в практику физико-химического исследования всего лишь 20–25 лет тому назад, однако уже завоевал себе прочную позицию среди других методов разделения самых близких по свойствам соединений благодаря своей исключительно высокой разделяющей способности в сочетании с простотой инструментального оформления и широчайшему кругу возможных объектов.

Действительно, с помощью этого метода возможно осуществить разделение как ионов малых молекул, с одной стороны, так и крупных полимерных и мицеллярных образований и даже бактерий и вирусов, с другой стороны. С помощью капиллярного электрофореза можно осуществить разделение веществ, обладающих ничтожными различиями по своим физико-химическим свойствам, как в случае атомов и ионов изотопов, изотопно-замещенных и изомерных молекул органических соединений. Ниже будут приведены такие примеры.

Несмотря на огромный массив накопленной к настоящему моменту информации, метод капиллярного электрофореза находится пока еще в начале своего развития и, несомненно, в будущем позволит достичь новых выдающихся результатов, выходящих за пределы самых необузданных фантазий.

Электрофорезом называется перемещение заряженных частиц (ионов, молекул, мицелл) в растворах под действием электрического поля. В том случае, когда переносящие электрические заряды частицы достигают электродов, создающих в растворе электрическое поле, и претерпевают на электродах те или иные химические превращения, процесс называют **электролизом**. Таким образом, электролиз всегда сопровождается процессом электрофореза, но не наоборот. Различные частицы, несущие электрические заряды, перемещаются в растворе с разной скоростью. Эти различия могут быть связаны, с одной стороны, с различиями в величине электрического заряда частиц, а, с другой стороны, с различным сопротивлением их движению в жидкости, связанным с различиями в величине и форме частиц, подвергающихся электрофорезу, а также с различным характером их сольватации применяемым растворителем. Такие различия в скорости движения частиц в электрическом поле определяют возможности использования этого явления для разделения различных веществ, в первую очередь таких, которые способны ионизироваться в растворе, образуя положительные или отрицательные ионы. Эти возможности были в известной мере реализованы уже в 30–50 годы XX столетия в форме методов электрофоретического разделения ряда биологически активных веществ, в

первую очередь белков и фрагментов ДНК (нуклеотидов) путем электрофореза на пропитанных электролитом листах бумаги, либо на слоях полиакриламидного геля. Такой метод гель-электрофореза оказался достаточно плодотворным для анализа сложных смесей биологически активных молекул. С его помощью был получен огромный объем информации, касающейся молекулярно-массового распределения многочисленных белков, нуклеотидов и нуклеиновых кислот.

Однако этим ранним вариантам электрофоретического метода была свойственна относительно невысокая разделяющая способность вследствие ограниченной длины разделяющих слоев, с одной стороны, и неравномерного разогрева их джоулевым теплом, с другой стороны. Этот последний фактор ограничивал также и напряженность приложенного электрического поля, что определяло невысокую скорость процесса. Так, разделение белков в заполненных полиакриламидным гелем трубках длиной 50–100 мм занимало несколько часов. Наиболее существенные из этих недостатков электрофоретического метода удалось преодолеть путем создания его капиллярного варианта – метода капиллярного зонного электрофореза, в котором разделение веществ по подвижности составляющих их частиц осуществляется в тонких капиллярных трубках диаметром 50–150 мкм и менее и длиной 10–100 см, выполненных из стекла, фторопласта или плавленого кварца. Этот аналитический метод был впервые осуществлен Миккерсом и Эверертсом [1] в конце семидесятых и Иоргенсом и Лукасом [2] в начале восьмидесятых годов прошлого столетия. Использование достаточно тонких капилляров обеспечило интенсивный отвод джоулева тепла, выделяющегося вследствие прохождения электрического тока через применяемый электролит. Таким образом, была устранена одна из главных в электрофорезе причин расширения и искажения дискретных зон разделяемых веществ.

Ряд методических приемов, рассмотренных подробно далее, позволил обеспечить формирование весьма узких зон присутствующих в пробе частиц, что также в значительной степени способствовало повышению качества достигаемого разделения. Наконец, в большей мере достаточно широкое распространение метода капиллярного электрофореза было связано с разработкой достаточно удобных и высокочувствительных методов детектирования разделенных фракций, к семидесятым годам прошлого столетия уже использовавшихся в методе высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Формирование узких зон разделяемых компонентов в капиллярном зонном электрофорезе происходит непосредственно в среде несущего электролита без каких-либо взаимодействий с внутренней поверхностью капилляра, которую следует рассматривать как неподвижную фазу. Между процессами высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза имеется значительное сходство в двух аспектах – в аппаратном оформлении и в выражении полученного результата в форме хроматограммы или электрофорограммы, включающей набор пиков, описываемых гауссовыми функциями и отвечающих отдельным разделенным компонентам анализируемой смеси. Наконец, большое сходство имеется и в проведении самой процедуры разделения: в капилляр для электрофореза вводится дискретная проба анализируемой смеси, а результат процесса разделения наблюдается некоторое время спустя в форме показаний детектора. Важно отметить, что существуют и достаточно широко используются такие варианты метода капиллярного электрофореза, в которых массообмен между подвижной и неподвижной фазами играет достаточно важную роль. Это в первую очередь электрофорез в капиллярах, заполненных полиакриламидным гелем. Этот метод является полным аналогом метода эксклюзионной хроматографии, отличаясь от

нее лишь не в пример более высокой разделяющей способностью. Весьма плодотворны также варианты мицеллярного электрофореза и электрофоретического разделения малых молекул в присутствии высокомолекулярных модификаторов, когда крупные и малоподвижные в электрическом поле мицеллы поверхностно-активных веществ или полимерные молекулы выполняют функцию неподвижной фазы по отношению к молекулам и ионам меньшего размера, и соответственно, более высокой подвижности. Эти процессы, электрофоретические по своему существу, часто по справедливости называют электрокинетической хроматографией.

Рассчитываемое по электрофорограмме число теоретических тарелок следует рассматривать как формальную величину, показывающую, какое число теоретических тарелок имела бы хроматографическая система, обеспечивающая такое же разделение, как и рассматриваемая электрофоретическая [3,5]. Такой подход будет вполне достаточным для целей настоящей книги, позволяя читателю сопоставить системы, описываемые в настоящей главе, с другими системами, рассмотренными в предшествующих разделах.

Теория капиллярного электрофореза, техника и методика этого метода и получаемые с его помощью результаты подробно рассмотрены в целом ряде монографий и обзоров [6–15], к которым и следует обратиться читателю, глубоко заинтересовавшемуся этим исключительно мощным методом анализа и разделения веществ. Здесь мы ограничимся кратким изложением наиболее важных моментов, достаточным для того чтобы ясно определить позицию капиллярного электрофореза среди других высокоэффективных методов разделения и показать большие возможности этого метода в настоящем и перспективны их развития в будущем.

10.1. Принципы капиллярного электрофореза

В своей простейшей форме капиллярный электрофорез осуществляется в экспериментальной установке, представленной схематически на рис. 10.1.

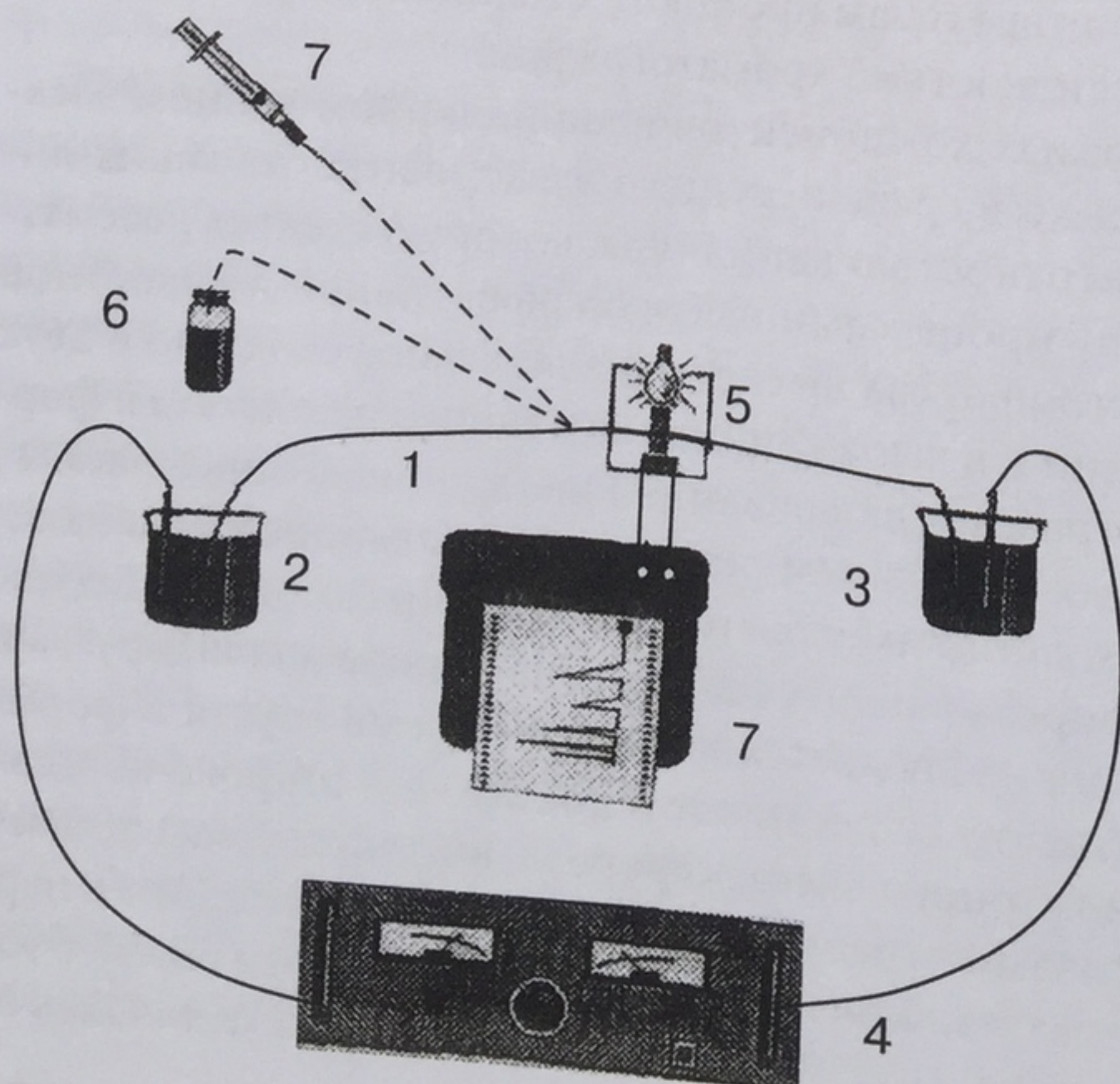


Рис. 10.1. Схема установки для капиллярного электрофореза: 1 — кварцевый капилляр диаметром 10–150 мкм; 2 — входной сосуд с буферным раствором; 3 — выходной сосуд с буферным раствором; 4 — источник высокого напряжения (10–30 кВ); 5 — детектор; 6 — сосуд с пробой, подлежащей анализу; 7 — микрошприц для ввода пробы [8].

Концы заполненного подходящим электролитом (буферным раствором) тонкого кварцевого капилляра диаметром 50–150 мкм погружают в два сосуда с таким же буферным раствором. В один из этих сосудов опускают положительный электрод, а в другой отрицательный электрод, соединенные с источником постоянного напряжения от 5 до 30 кВ. В тот конец капилляра, который погружен в сосуд с положительным электродом, вводят небольшое количество раствора (несколько нанолитров) подлежащей анализу пробы. Способы ввода таких проб рассмотрены далее. После ввода пробы к электродам в сосудах с буферным раствором прикладывают электрическое напряжение, которое вызывает электрофоретическую миграцию компонентов пробы. Различие в ионной подвижности отдельных частиц, входящих в состав анализируемой пробы, вызывает их разделение на дискретные более или менее резко разграниченные зоны, поочередно проходящие через детектирующее устройство, регистрирующее электрофорограмму – график зависимости сигнала детектора от времени.

Процесс электрофореза, т.е. перемещение в капилляре несущих электрический заряд частиц под действием электрического поля обычно сопровождается более или менее интенсивным течением буферного раствора (переносащего электролита) от анода к катоду. Этот так называемый электроосмотический поток может совпадать по направлению с электрофоретическим перемещением разделяемых частиц или может иметь противоположное направление. При этом он может ускорять или замедлять электрофоретическое перемещение и таким образом активно влиять на форму результирующей электрофорограммы.

Скорость электрофоретического перемещения ионов определяется их электрофоретической подвижностью μ и напряженностью электрического поля в капилляре E :

$$V = \mu E = L_{\text{eff}} / t \quad (10.1)$$

где t – время электрофоретического перемещения вещества

$$E = \frac{V_{\text{eff}}}{L_{\text{eff}}} \quad (10.2)$$

причем L_{eff} – это длина капилляра от его входа до места расположения детектора, а V_{eff} – приложенное на этом участке напряжение:

$$V_{\text{eff}} = \frac{V}{L} L_{\text{eff}} \quad (10.3)$$

где V – полная величина напряжения, приложенного к электродам электрофоретической системы, а L – полная длина капилляра.

Ускоряющая сила электрического поля F_{ac} , действующая на отдельный ион или иную заряженную частицу, может быть выражена следующим образом

$$F_{\text{ac}} = \frac{z \times E}{N} F \quad (10.4)$$

где z – эффективный заряд частицы, N – число Авогадро, а F – константа Фарадея, равная 96 500 Кул/моль.

При установившемся режиме движения частиц эта сила равна силе торможения за счет внутреннего трения в жидкости F_{fr} , которая может быть описана формулой закона Стокса:

$$F_{fr} = 6\pi\eta \times r \times U = 6\pi\eta \times r \frac{L_{eff}}{t} \quad (10.5)$$

где r – стоксовский радиус, а η – динамическая вязкость жидкости.

Отсюда можно определить время электрофоретического перемещения (время миграции) данного иона или иной заряженной частицы t_m (без влияния электроосмотического потока).

$$t_m = \frac{6\pi\eta \times L_{eff} \times L_{tot} N_a}{VF} \times \frac{r}{z} = \beta \times \frac{r}{z} \quad (10.6)$$

где β – константа для данной электрофоретической системы. Из этой формулы видно, что время миграции различных заряженных частиц в электрофоретической системе, определяющееся отношением их эффективного радиуса к заряду, будет различным, что и определяет возможность их разделения в электрическом поле. Эти соотношения оказываются действительными в том случае, когда в электрофоретической системе отсутствует течение электропроводящего буферного раствора, как, например, в капилляре, заполненном полиакриламидным гелем (см. ниже). Однако в полых капиллярах при наложении электрического поля всегда возникает вызываемое этим полем движение электролита – электроосмотический поток, связанный с наличием поверхностных электрических зарядов. Так, в водных средах, как правило, поверхность кварцевых и стеклянных капилляров несет отрицательные заряды, связанные с диссоциацией поверхностных силанольных групп в водно-солевых растворах. Поэтому в жидкости возникает распределенный электрический заряд, связанный с локализацией вблизи поверхности противоионов с противоположным знаком электрического заряда. В результате у поверхности капилляра возникает двойной электрический слой, включающий неподвижные ионы, несущие положительные заряды и связанные кулоновскими силами с отрицательными зарядами поверхности, и подвижные ионы, распределяющиеся между малоподвижным слоем ионов и прилегающим к нему диффузионным слоем. При этом между слоем неподвижных зарядов у поверхности и основной массой раствора возникает определенная разность электрических потенциалов, обыкновенно обозначаемая как ξ -потенциал. Данные о ξ -потенциалах большого числа веществ опубликованы в целом ряде источников [16–18]. Электрическое поле, приложенное по оси капилляра, вызывает миграцию противоионов подвижного слоя, что приводит к движению электролита в капилляре, которое и называется **электроосмотическим потоком**.

В связи с тем что электродинамические силы, определяющие электроосмотический поток, приложены вблизи стенок капилляра, в нем формируется плоский профиль скоростей жидкости, существенно отличающийся от параболического профиля скоростей, характерного для пуазейлевского течения вязкой жидкости. При этом практически полностью исключается явление расширения дискретных зон разделяемых соединений под влиянием неоднородного поля скоростей в капилляре. Это является одной из наиболее важных причин, определяющих высокую эффективность разделения, характерную для капиллярного электрофореза.

Скорость электроосмотического потока может быть оценена с помощью уравнения Гельмгольца:

$$U = \mu_i \times E = \frac{\epsilon \times E \times \xi}{4\pi\eta} \quad (10.7)$$

Эта величина прямо пропорциональна диэлектрической проницаемости ϵ , напряженности электрического поля E , величине ξ – потенциала (связанной с плотностью поверхностных зарядов на внутренней поверхности в капилляре) и обратно пропорциональна вязкости электролита.

В связи с тем что в кварцевых капиллярах диффузионный электрический слой образован, в основном, положительно заряженными ионами, в них электроосмотический поток направлен от анода к катоду. В общем, электроосмотический поток в кварцевых капиллярах увеличивается при увеличении рН и уменьшении концентрации и ионной силы раствора электролита. Кроме того, электроосмотический поток уменьшается при добавлении к электролиту органических компонентов. С другой стороны, направление и интенсивность электроосмотического потока можно изменять путем добавления к электролиту поверхностно-активных веществ. Так, например, если к электролиту добавить катионное поверхностно-активное вещество, то на поверхности капилляра формируется слой положительно заряженных частиц с отрицательными противоионами в диффузионном электрическом слое. Это приводит к изменению направления электроосмотического потока, который в этом случае переносит жидкость от катода к аноду.

На рис. 10.2 представлены графики зависимости скорости электроосмотического потока от рН электролита при постоянной ионной силе для трех наиболее часто применяемых материалов капилляра – стекла, кварца и фторопласта.

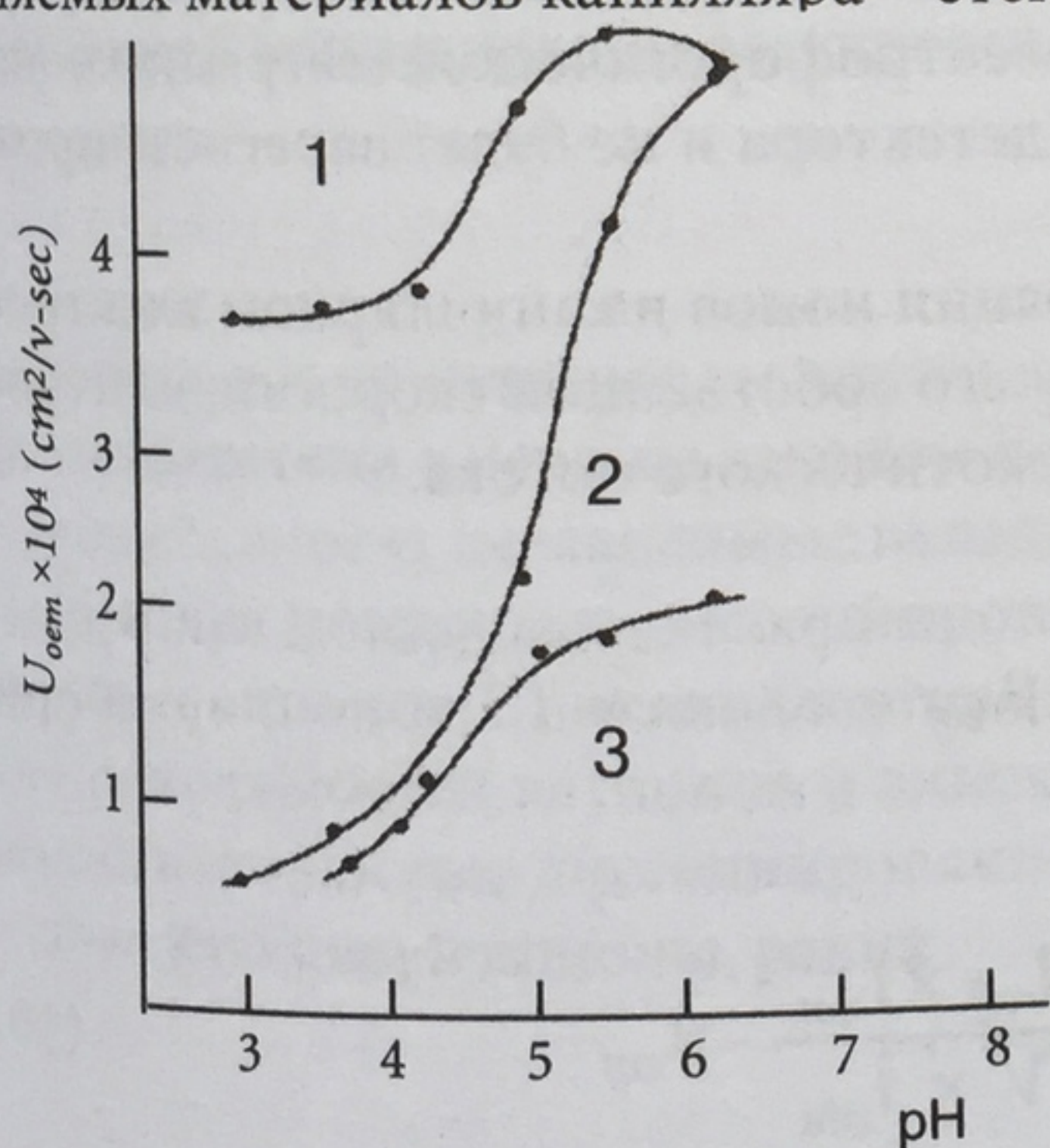


Рис. 10.2. Зависимость скорости электроосмотического потока в капиллярах из разных материалов от величины рН переносящего электролита [16]: 1 – стекло Пирекс; 2 – плавленый кварц; 3 – фторопласт (Тефлон)

Легко видеть, что скорость электроосмотического потока можно регулировать в довольно широких пределах, изменяя величину рН электролита или меняя материал капилляров.

В большинстве практически важных случаев для индикации скорости электроосмотического потока в состав анализируемой пробы вводят какое-либо вещество, не ионизирующееся в применяемом электролите, но хорошо регистрируемое детектором. При использовании метода детектирования по поглощению УФ-света удобным веществом такого рода является бензиловый спирт.

Как и в хроматографии, простейшей качественной характеристикой веществ, подвергаемых электрофоретическому разделению, является аналогичное времени удерживания наблюдаемое время миграции вещества от входа капилляра до детектора, t_{obs} . Соответственно, для того чтобы можно было сопоставлять результаты, получаемые при использовании капилляров разной длины более удобной величиной является наблюдаемая скорость миграции

$$y_{obs} = L_{eff} / t_{obs} \quad (10.8)$$

где L_{eff} — длина капилляра от его входа до точки детектирования.

Для того чтобы иметь возможность сопоставлять данные о характере электрофоретической миграции веществ не только в капиллярах разной длины, но и при разных приложенных напряжениях, можно рассчитать величину наблюдаемой электрофоретической подвижности μ_{obs} :

$$\mu_{obs} = \frac{y_{obs}}{E} = \frac{L_{eff}}{t_{obs}} \times \frac{L_{tot}}{V} \quad (10.9)$$

где L_t — полная длина капилляра, а V — приложенное напряжение.

Как указано ранее, в полых капиллярах при наложении электрического поля всегда возникает электроосмотический поток. Направление этого потока может совпадать с направлением электрофоретической миграции частицы, несущей электрический заряд, и может быть противоположным ему. В первом случае необходимая скорость миграции превышает скорость собственной миграции иона, во втором — оказывается меньшей на величину скорости электроосмотического потока. Если при этом последний параметр окажется меньшим, чем собственная скорость электрофоретической миграции иона, то зона данного иона вообще не сможет достичь детектора и не будет зарегистрирована на электрофорограмме.

Таким образом, наблюдаемая скорость миграции ионов в капиллярном электрофоре-
резу представляет собой алгебраическую сумму его собственной скорости электрофоретической подвижности и скорости электроосмотического потока.

Таким образом

$$\mu_{obs} = \mu_{ion} + \mu_{eof} \quad (10.10)$$

Отсюда

$$\mu_{ion} = \mu_{obs} - \mu_{eof} = \frac{L_{eff} \times L_{tot}}{V \times t_{obs}} - \mu_{eof} \quad (10.11)$$

Ориентировочные значения собственной электрофоретической подвижности μ_{ion} можно рассчитать из величин предельных ионных эквивалентных проводимостей, причем z_i — валентное число электрона, e — заряд электрона ($1,602 \times 10^{-19}$ Кул), а η — динамическая вязкость электролита.

Электрофоретическая миграция ионов или иных частиц, несущих электрический заряд, имеет место всегда при наличии электрического поля в среде жидкого электролита. Макроскопическим проявлением электрофоретической миграции в электролите

является возникновение электрического тока, J , связанного с приложенным напряжением V законом Ома:

$$V = RJ \quad (10.12)$$

где R – электрическое сопротивление электролита.

В электрохимических исследованиях чаще используют величину электрической проводимости, S , обратную омическому сопротивлению:

$$S = J/R \quad (10.13)$$

Значения проводимости в каждом конкретном случае могут быть измерены с помощью кондуктометра. Единицей измерения проводимости служит обратный Ом (Ом^{-1}) или Сименс ($\text{См} = \text{Ом}^{-1}$).

Измеряемая величина проводимости зависит от геометрии измерительной ячейки, природы ионов, участвующих в переносе электрических зарядов, и от концентрации электролита. Из измеренных величин проводимостей можно вычислить значение удельной проводимости S_{sp} путем деления измеренных величин на постоянную ячейки χ :

$$S_{sp} = S / \chi \quad (10.14)$$

Влияние концентрации электролита учитывают, вычисляя эквивалентную или мольную проводимость λ путем деления удельной проводимости на величину эквивалентной или мольной концентрации электролита $[C_{eq}]$:

$$\lambda_{eq} = S_{sp} / [C_{eq}] \quad (10.15)$$

Эквивалентные концентрации используют в случае многозарядных ионов.

В соответствии с первым законом Кольрауша анионы и катионы диссоциирующего электролита вносят независимые вклады в величину его эквивалентной проводимости. При этом для полностью диссоциированного электролита с мольным соотношением катионов и анионов 1:1 эквивалентная проводимость равна сумме ионных эквивалентных проводимостей катионов и анионов λ^+ и λ^- . Таким образом, эквивалентная проводимость полностью диссоциированного электролита, в состав которого входят однозарядные катионы и анионы, равна

$$\lambda_{eq} = \lambda^+ + \lambda^- \quad (10.16)$$

В соответствии с уравнением (10.14) эквивалентная проводимость не должна зависеть от концентрации. Однако это положение оправдывается только при бесконечно малых концентрациях (при бесконечном разбавлении). При более значительных концентрациях эмпирически установлено, что эквивалентная проводимость линейно зависит от квадратного корня из концентрации C (второй закон Кольрауша)

$$\lambda_{eq} = \lambda_0 - k\sqrt{C} \quad (10.17)$$

где λ_0 – предельное значение эквивалентной проводимости, а k – константа.

Величины предельных эквивалентных проводимостей определены для многих ионов и достаточно широко представлены в многочисленных справочниках. Величины этого параметра для некоторых одновалентных ионов приведены в табл. 10.1. Для слабых электролитов величина эквивалентной проводимости зависит от степени диссоциации:

$$\alpha = \frac{\lambda \times c}{\lambda_0} \quad (10.18)$$

где α – степень диссоциации электролита, как обычно, равная отношению концентрации диссоциировавших молекул к общей концентрации электролита в растворе.

Таблица 10.1. Значение предельной эквивалентной проводимости для некоторых однозарядных ионов

Ион	λ_0^+ (см ² × Ом ⁻¹ × моль ⁻¹)	Ион	λ_0^- (см ² × Ом ⁻¹ × моль ⁻¹)
H ⁺	349,8	OH ⁻	198,6
Li ⁺	38,7	F ⁻	55,4
Na ⁺	50,1	Cl ⁻	76,4
K ⁺	73,5	Br ⁻	78,1
Rb ⁺	77,8	I ⁻	76,8
NH ₄ ⁺	73,6	NO ₃ ⁻	71,5
N(CH ₃) ₄ ⁺	44,9	HCO ₃ ⁻	44,5
N(C ₂ H ₅) ₄ ⁺	32,7	CH ₃ COO ⁻	40,9

Для более точного учета всех факторов, определяющих ионную проводимость (в частности, электростатическое взаимодействие разнозарядных ионов в растворе), используют эмпирический коэффициент проводимости f_c :

$$\alpha = \frac{\lambda \times c}{\lambda_0} \times f_c \quad (10.19)$$

Связь эквивалентной ионной проводимости с константой диссоциации и концентрацией электролита в растворе описывается законом Оствальда:

$$K_d = \frac{\lambda \times c^2}{(\lambda_0 - \lambda_c) \times \lambda_0} \times C \quad (10.20)$$

или согласно уравнению (10.17)

$$K_d = \frac{\lambda \times c^2}{k \times \lambda_0} \times \sqrt{C} \quad (10.21)$$

Если не принимать во внимание ионные взаимодействия (то есть рассматривать условия бесконечного разбавления), то в гомогенном электрическом поле на заряженную частицу действует электродинамическая сила F_e :

$$F_e = Z_i \times e_0 \times E \quad (10.22)$$

где Z_i – заряд частицы; e_0 – заряд электрона ($1,602 \times 10^{19}$ Кл); E – напряженность электрического поля (В/см).

В вязкой среде при установившейся скорости движения частицы электродинамическая сила уравновешивается действием тормозящей силы F_f .

$$F_f = k \times \eta \times V_i^0 \quad (10.23)$$

где k – константа, η – ньютоновская вязкость среды, а V_i^0 – скорость движения частицы. Согласно закону Стокса, для частиц сферической формы

$$k = 6\pi \times r \quad (10.24)$$

откуда скорость движения частицы, т.е. скорость ее электрофоретической миграции, равна

$$V_i^0 = \frac{Z_i \times e_0}{6\pi\eta r_i} \times E = \mu_0 \times E \quad (10.25)$$

Коэффициент пропорциональности в этом уравнении носит название абсолютной или предельной электрофоретической подвижности. Эта величина по своему физическому смыслу представляет собой скорость перемещения данной заряженной частицы при бесконечно малой концентрации и при единичной напряженности электрического поля. При этом скорость миграции и электрофоретическая подвижность могут иметь положительное или отрицательное значение по отношению к ориентации электрического поля в зависимости от знака заряда частицы Z_i . Таким образом, абсолютная электрофоретическая подвижность является векторной величиной и μ_0 представляет собой характеристическую константу для данной частицы (иона) при постоянной температуре. Эта величина пропорциональна эквивалентной проводимости при бесконечном разбавлении.

Для бинарного электролита эквивалентная проводимость при бесконечном разбавлении λ_0 , равна сумме эквивалентных проводимостей и пропорциональна сумме абсолютных электрофоретических подвижностей (взятых по их абсолютной величине) слагающих ионов, причем коэффициент пропорциональности равен константе Фарадея ($F = 96\,500$ Кул/моль).

В реальных условиях электрофорез осуществляется при конечных концентрациях электролита в растворе и в присутствии других ионов, активно взаимодействующих с ионами разделяемых соединений. Эти обстоятельства активно влияют на наблюдаемые экспериментально электрофоретические подвижности ионов. Так, например, фактически действующий заряд ионов слабых электролитов оказывается меньше расчетного теоретического значения вследствие неполной диссоциации. Кроме того, каждый ион в растворе электролита окружен противоионами, несущими электрические заряды противоположного знака. Эти противоионы, образуя так называемую ионную атмосферу, в некоторой степени замедляют движение иона в электрическом поле. Согласно теории Дебая – Хюккеля – Онзагера такое замедление является следствием проявления силы электрофоретического замедления и релаксационного эффекта, связанных с тем,

что движение заряженной частицы в электрическом поле вызывает деформацию окружающего поля противоионов (ионной атмосферы), так что плотность зарядов впереди движущегося иона оказывается всегда несколько меньшей, чем позади его. Эта деформация возникает и уничтожается действием сил кулоновского взаимодействия, однако вызывая некоторый тормозящий эффект по отношению к электрофоретической миграции данного иона. Такие межионные взаимодействия оказываются тем более интенсивными, чем выше концентрация применяемого электролита.

Входящий в уравнение (10.25) гидродинамический или Стоксовский радиус иона r_i представляет собой радиус сольватированного (в водных растворах гидратированного) иона. Эта величина заметно отличается от значений кристаллографического радиуса, получаемых из данных рентгеноструктурного анализа. Учет влияния ионной силы и атмосферы противоионов делает необходимым использование еще больших величин – эффективных ионных радиусов R . С другой стороны, влияние ионной атмосферы может быть уточнено путем замены теоретического заряда иона $Z_i e$ значением его эффективной величины, Q_{eff} , которая, конечно, всегда будет меньше теоретической величины. В результате эффективная электрофоретическая подвижность иона будет выражаться следующим уравнением:

$$\mu_i = \frac{Q_{eff}}{6\pi\eta R} \quad (10.26)$$

Понятно, что полученная величина μ , всегда будет меньше предельного значения абсолютной электрофоретической подвижности. С другой стороны, в большинстве случаев ионы, несущие одинаковый электрический заряд, отличаются друг от друга как по величине эффективного заряда, связанного с окружающей ионной атмосферой, так и по величине эффективного радиуса, связанного с плотностью зарядов иона. Теория и практика электрофоретических методов анализа показывают, что эти различия достаточно специфичны для очень близких по химической структуре и строению ионов, что обеспечивает возможность их электрофоретического разделения, включая изомерные и изотопные соединения с минимальными различиями их физических и химических свойств.

В тех случаях, когда подлежащее электрофоретическому анализу вещество существует в растворе в нескольких формах, находящихся в динамическом равновесии друг с другом и имеющих различные абсолютные подвижности, эффективная подвижность μ_i этого соединения может быть выражена следующим образом:

$$\overline{\mu}_s = \sum_{i=1}^{i=n} x_i \times \mu_i \quad (10.27)$$

где x_i – мольная доля каждой из присутствующих в растворе форм данного вещества. Это соотношение применимо в случае многоосновных кислот, многоатомных аминов, а также в случае соединений, имеющих таутомерные формы.

На практике величины эффективных подвижностей отдельных ионов обычно определяют из зарегистрированных электроферограмм следующим образом.

При наличии в анализируемой смеси компонентов, образующих ионы с положительным и отрицательным знаком заряда, типичная электроферограмма может иметь вид, такой как на рис. 10.3. Электрически нейтральное соединение (бензиловый спирт, пик 2) движется со скоростью электроосмотического потока (ЭОП). Катионное соеди-

Рис. 10.3. Типичная эле-
1 – хлорид бензилтриме-
скорости электроосмот-
4 – 4-октилбензоат; 5 –
США); кварцевый капи-
температура 25°C; УФ-
концентрацией 50 мМ,

нение-хлорид бен-
троосмотического

Карбоксилат-и-
меньшими скорос
гистрируемые поз
жет быть охаракт
капилляра L_D от
скорость миграц
потока, то можно
скорость электро
нейтрального ма

Понятно, что вызывает на напряжение электрооси электрофорети

где L_T — полная
напряженность.

В том случае, когда осмотическое давление электролита

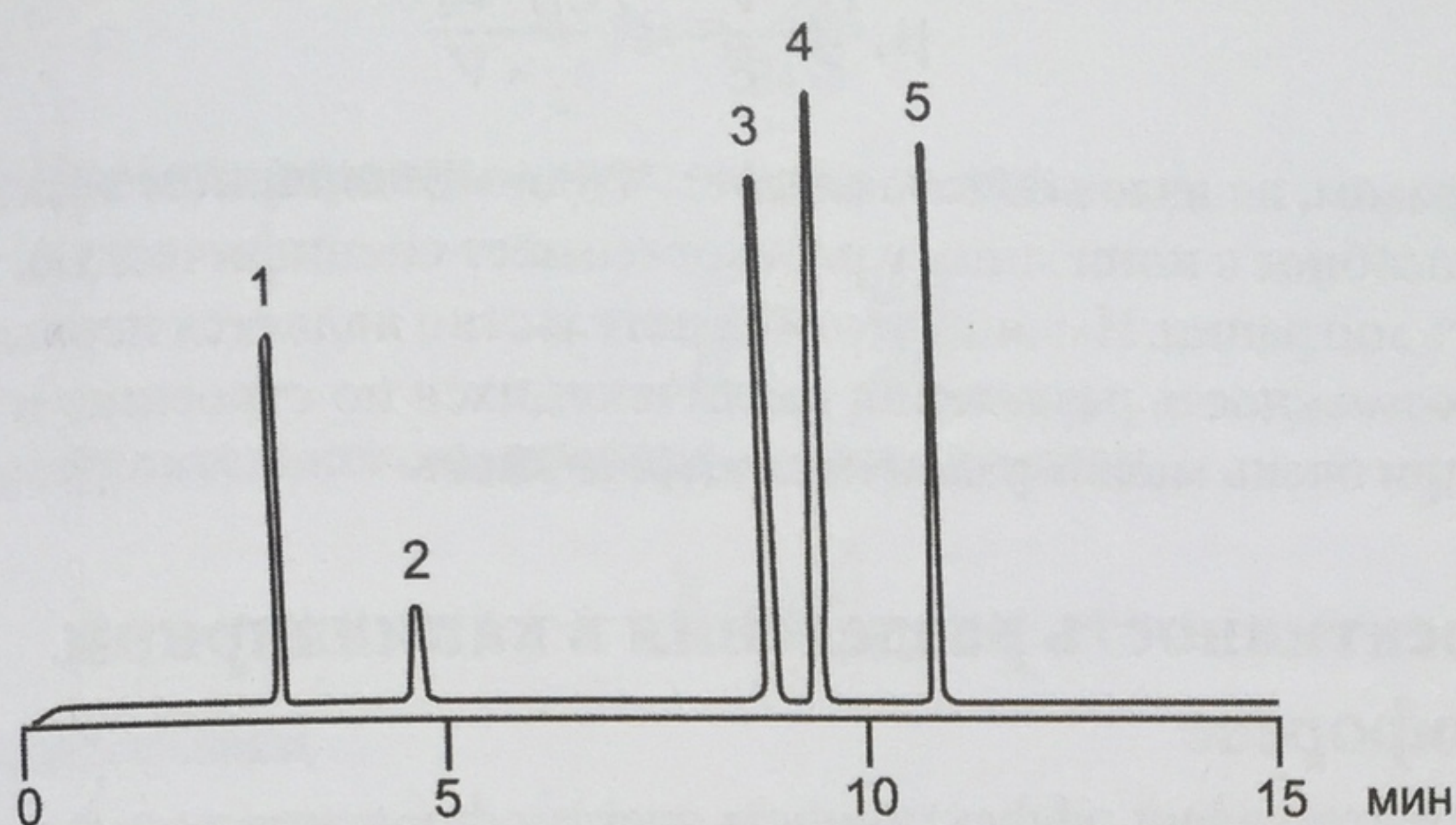


Рис. 10.3. Типичная электрофорограмма смеси веществ, образующих ионы с разным знаком заряда: 1 – хлорид бензилтриметиламмония; 2 – бензиловый спирт (неионизирующее вещество – индикатор скорости электроосмотического потока); 3 – ацетилсалицилат; 4 – 4-октилбензоат; 5 – бензоат. Условия эксперимента: прибор Бекман Р/АСЕ 2000 (фирма «Бекман», США); кварцевый капилляр длиной 57 см и диаметром 75 мкм; напряженность поля 263 В/см; температура 25°C; УФ-детектирование при длине волны 200 нм; электролит – фосфатный буфер с концентрацией 50 мМ, рН 7.0. Ввод пробы гидродинамическим способом (см. ниже) в течение 1 с [8]

нение – хлорид бензилтриметиламмония движется в электрическом поле быстрее электроосмотического потока и образует пик 1.

Карбоксилат-ионы 3–5 движутся в противоположную сторону, но со скоростями, меньшими скорости электроосмотического потока, и поэтому образуют пики 3–5, регистрируемые позже маркера ЭОП. Каждый из зарегистрированных компонентов может быть охарактеризован своим временем миграции t_i . Деление эффективной длины капилляра L_D от его входа до детектора на время миграции компонента дает полную скорость миграции. Если из этой величины вычесть скорость электроосмотического потока, то можно получить скорость электрофоретической миграции $v_{i(net)}$. Понятно, что скорость электроосмотического потока v_{eo} можно рассчитать по времени регистрации нейтрального маркера (пик 2 на рис. 10.3). Таким образом:

$$v_i = v_{i(net)} - v_{eo} = \frac{L_D}{t_i} - \frac{L_D}{t_{eo}} \quad (10.28)$$

Понятно, что при $t_i > t_{eo}$ величины v_i будут иметь отрицательные значения, что указывает на направление миграции соответствующих ионов по отношению к направлению электроосмотического потока. Из полученных величин легко определить значение электрофоретической подвижности компонента i :

$$\mu_i = \frac{v_i}{E} = \frac{v_i \times L_T}{V} \quad (10.29)$$

где L_T – полная длина капилляра (расстояние между электродами), а V – приложенное напряжение.

В том случае, когда капиллярный электрофорез осуществляется в отсутствие электроосмотического потока, как, например, при электрофорезе в капиллярах, заполненных электропроводящим гелем, уравнение (10.29) принимает вид:

$$\mu_i = \frac{V_i}{E} = \frac{L_D \times L_T}{t_i \times V} \quad (10.30)$$

Таким образом, из изложенного следует, что в капиллярном электрофорезе каждое вещество, способное к ионизации в растворе, имеет специфическую, только ему присущую скорость миграции. Именно это обстоятельство является первым условием, определяющим возможность разделения различающихся по строению и свойствам соединений даже при очень малых различиях этих свойств.

10.2. Эффективность разделения в капиллярном электрофорезе

Как и в хроматографии, эффективность электрофоретического процесса может быть оценена числом теоретических тарелок, рассчитываемых из величин времени миграции и ширины электрофоретических пиков, зарегистрированных, как и в хроматографии, в форме, близкой к кривым Гаусса. Правомерность такой оценки для электромиграционных методов была обоснована Гиддингсом в 1969 г. [3, 21].

Основными факторами, вызывающими расширение дискретных зон в капиллярном электрофорезе, являются продольная диффузия вещества из центральной области зоны вперед и назад по направлению ее движения, начальная ширина зоны вводимой в капилляр пробы, и термические эффекты, связанные с выделением джоулева тепла при протекании электрического тока через заполненный электролитом капилляр. Ниже эти эффекты будут рассмотрены более подробно. В капиллярном зонном электрофорезе, в отличие от хроматографии в тонких капиллярах, практически незначимы эффекты расширения хроматографических зон вследствие параболического распределения скоростей по сечению капиллярной трубки и вследствие конечной скорости массообмена и установления сорбционного равновесия. Однако два последних фактора могут оказывать серьезное влияние в некоторых вариантах электрокинетической хроматографии, когда разделение веществ осуществляется не только за счет разной скорости миграции анализируемых компонентов в электрическом поле, но и вследствие различий в интенсивности их взаимодействия с неподвижной фазой, т.е. со стенками капилляра или с заполняющей его средой. Процесс расширения дискретной зоны вещества в капилляре может быть описан уравнением Эйнштейна:

$$\sigma^2 = 2Dt \quad (10.31)$$

где σ^2 – пространственная дисперсия хроматографической зоны, D – коэффициент диффузии вещества в электролите, а t – время миграции.

Так как высота, эквивалентная теоретической тарелке H , равна σ^2/x , где x – длина пути движения хроматографической зоны, то

$$H = \frac{2Dt}{x} = \frac{2D}{v} \quad (10.32)$$

где v – скорость движения зоны, равная μE . Отсюда:

$$H = \frac{2D}{\mu E} \quad (10.33)$$

Тогда число теоретических тарелок можно выразить, как

$$n = \frac{x}{H} = \frac{\mu E}{2D} \quad (10.34)$$

Для всей длины разделительного капилляра можно заменить

$$E = \frac{V}{L_t} \quad (10.35)$$

что дает после подстановки

$$n = \frac{\mu v}{2D} \quad (10.36)$$

Учитывая наличие электроосмотического потока, обеспечивающего общую скорость миграции $\mu = \mu_i + \mu_{of}$ получим

$$n = \frac{(\mu_i + \mu_{of}) \times v}{2D} \quad (10.37)$$

Это простое рассмотрение, выполненное в работе [2], приводит к выводу о том, что в капиллярном электрофорезе число теоретических тарелок не зависит от длины применяемого капилляра и прямо связано с используемым напряжением. Однако это заключение не вполне корректно, так как при данном напряжении на электродах v скорость электроосмотического потока μ_{of} будет зависеть как от полной, так и от эффективной длины применяемого капилляра. Достижимая степень разделения двух близких пиков в капиллярном электрофорезе, как и в хроматографии, определяется как отношение расстояния между максимумами пиков к их средней ширине:

$$R = \frac{\Delta x}{4\sigma} = \frac{x_2 - x_1}{a_{1/2(1)} + a_{1/2(2)}} \quad (10.38)$$

в предположении, что $x_2 > x_1$.

Расстояние между максимумами пиков Δx пропорционально разнице скоростей миграции $(v_2 - v_1)$, так что

$$\frac{\Delta x}{x} = \frac{\Delta V}{V} \quad \text{и} \quad \Delta x = \bar{x} \times \frac{\Delta V}{V} \quad (10.39)$$

Тогда степень разделения можно выразить следующим образом

$$R = \frac{\bar{x} \times \Delta V}{4\sigma \times V} \quad (10.40)$$

Учитывая, что

$$H = \frac{\sigma^2}{x} \quad \text{и} \quad n = \frac{x}{H} \quad (10.41)$$

можно выразить зависимость достигаемой степени разделения от числа теоретических тарелок, характеризующего данный процесс:

$$R = \frac{\sqrt{n}}{2} \times \frac{\Delta V}{(V_1 + V_2)} \quad (10.42)$$

Тогда соотношение $\frac{\Delta V}{V}$ будет равно:

$$\frac{2\Delta V}{V_1 + V_2} = \frac{2(\mu_1 - \mu_2)}{(\mu_1 + \mu_2)} \quad (10.43)$$

При наличии электроосмотического потока уравнение (10.43) принимает форму:

$$\frac{2\Delta V}{V_1 + V_2} = \frac{(\mu_1 - \mu_2)}{\frac{\mu_1 + \mu_2}{2} + \mu_{eof}} \quad (10.44)$$

Подставляя уравнение (10.40) и (10.31) в уравнение (10.42), можно получить выражение

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{\frac{\left[\frac{\mu_1 + \mu_2}{2} + \mu_{eof}\right] \times V}{2D}} \times \frac{\mu_1 - \mu_2}{\frac{\mu_1 + \mu_2}{2} + \mu_{eof}} \quad (10.45)$$

или после преобразований

$$R = \frac{1}{4} \times (\mu_1 - \mu_2) \times \sqrt{\frac{V}{2D \left(\frac{\mu_1 - \mu_2}{2} + \mu_{eof} \right)}} \quad (10.46)$$

Из этого выражения следует, что достигаемое разделение двух близких пиков в капиллярном электрофорезе, с одной стороны, увеличивается при увеличении разницы в величинах электрофоретической подвижности двух веществ и с ростом приложенного напряжения, а с другой стороны, уменьшается с возрастанием электроосмотического потока. Можно показать, что максимальная степень разделения будет достигнута при равенстве

$$\mu_{eof} = \bar{\mu} - \frac{\mu_1 + \mu_2}{2} \quad (10.47)$$

Результаты расчетов величин достигаемой степени разделения по уравнению (10.46) представлены на рис. 10.4 [8]. При этих расчетах предполагалось, что электрофоретическая подвижность одного из компонентов постоянна и равна $5 \times 10^{-5} \text{ см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$, а подвижность второго компонента варьирует в пределах 30% от этой величины. Расчеты проводились для капилляра длиной 50 см при приложенном напряжении 300 В/см. Коэффициенты диффузии D были приняты равными $10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$.

Полученные графики показывают, что наилучшее разделение достигается при движении электроосмотического потока в противоположном направлении по отношению к разделяемым веществам.

Из формулы (10.46) видно, что величины R не определены для случаев, когда $\mu_{eof} \leq |-\bar{\mu}|$.

Как и в хроматографии, в капиллярном электрофорезе используют величину коэффициента разделения α , выражаемого как отношение времен миграции двух компонентов:

$$\alpha = \frac{t_2}{t_1} \quad (10.48)$$

причем $t_2 \geq t_1$, так что всегда $\alpha \geq 1$.

В отличие от хроматографии в капиллярном электрофорезе отсутствуют поправки на мертвое время, так что t_2 и t_1 — это значения полного времени миграции от момента приложения электрического поля до момента регистрации максимума пика детектора.

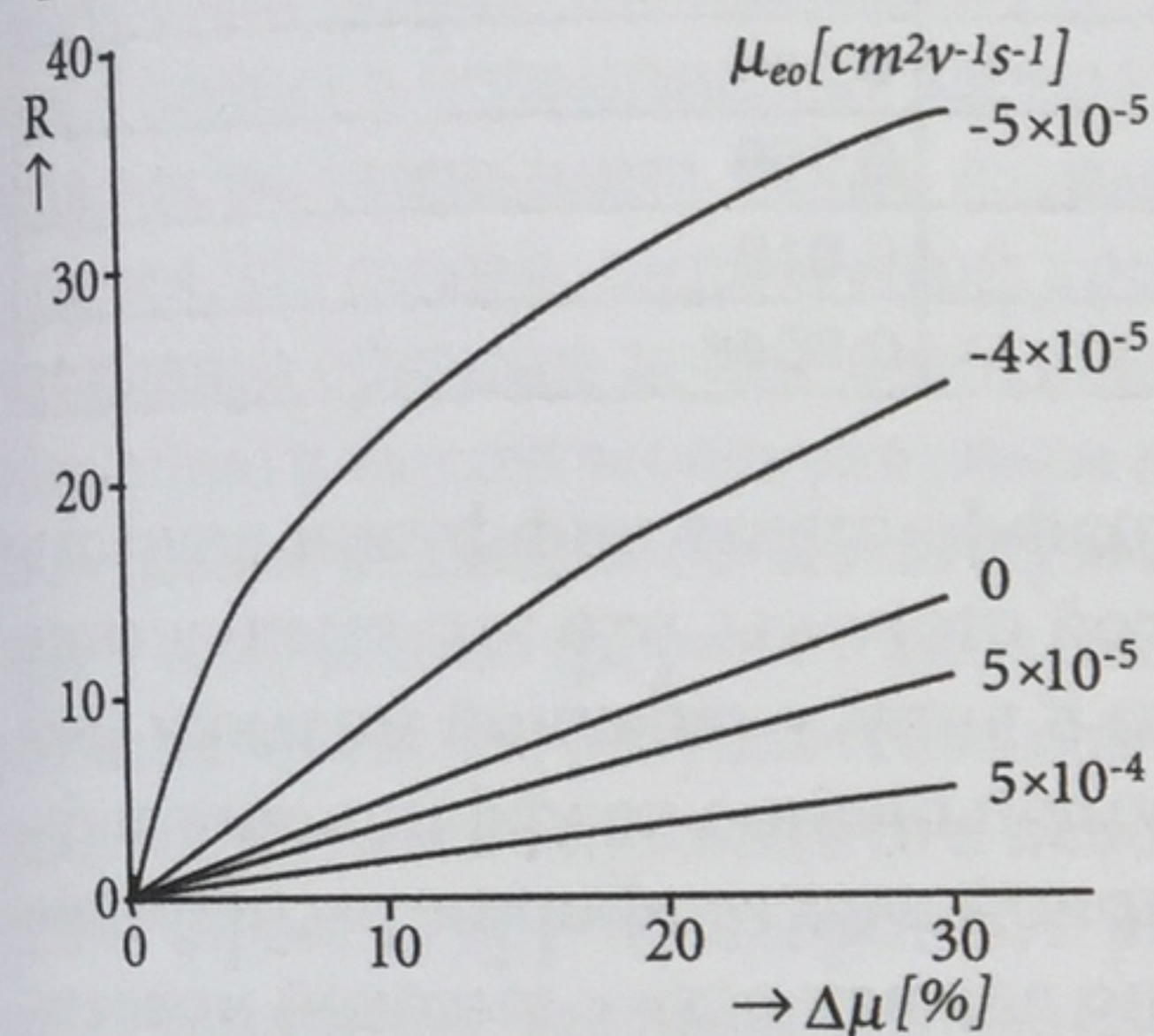


Рис. 10.4. Зависимость достигаемой степени разделения двух компонентов от разницы в их электрофоретической подвижности (числа у кривых). Электрофоретическая подвижность первого компонента принята равной $5 \times 10^{-5} \text{ см}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$

10.3. Факторы, влияющие на достигаемое разделение

10.3.1. Диффузия

Наличие узких зон разделяемых соединений в капиллярном электрофорезе неизбежно приводит к диффузии вещества из области более высокой концентрации в центральной части зоны вперед и назад по ходу ее движения, где концентрация вещества меньше. Как уже было указано выше, вклад диффузии в общую дисперсию зоны можно описать как $\sigma^2 = 2Dt$, где t — время миграции, D — коэффициент диффузии. Согласно закону Фика

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (10.49)$$

где k — постоянная Больцмана.

Коэффициент диффузии пропорционален температуре и зависит от вязкости среды и от гидравлического радиуса мигрирующей частицы. Понятно, что эта последняя величина будет зависеть от величины молекулы, т.е. от молекулярной массы вещества. Эту зависимость иллюстрирует табл. 10.2 [22].

Таблица 10.2. Молекулярные массы и коэффициенты диффузии некоторых веществ при 20 или 25° С

Вещество	Молекулярная масса, а. е. м.	Коэффициент диффузии, $10^5 \text{ см}^2/\text{с}$
Na^+	23	1,25
Этанол	46	1,08
Валин	117,2	0,74
Триптофан	204,2	0,61
Глюкоза	180	0,56
Сахароза	342	0,42
Цитохром С	13370	0,11
Альбумин плазмы крови человека	68000	0,069
Фибриноген человека	339700	0,019
Вирус табачной мозаики	40590000	0,0046

Из этой таблицы видно, с одной стороны, что коэффициент диффузии веществ уменьшается с ростом молекулярной массы, а с другой стороны, что это уменьшение относительно медленное. Так, при переходе от этанола к вирусу табачной мозаики увеличение молекулярной массы в миллион раз ведет к уменьшению коэффициента диффузии всего лишь в ~ 200 раз. Тем не менее в капиллярном электрофорезе расширение зон вследствие продольной диффузии менее выражено для веществ с высокой молекулярной массой, что делает этот метод особенно пригодным для разделения и анализа именно таких компонентов.

Коэффициент диффузии любого соединения легко определить с помощью капиллярного электрофореза методом «остановленного потока». При этом, определив в отдельном опыте время миграции вещества через применяемый капилляр, в другом опыте осуществляют электрофорез, в процессе которого выключают электрическое поле на период времени, достаточный для заметного расширения зоны под действием продольной диффузии. Это время может изменяться от нескольких минут до нескольких часов. После этого вновь включают электрическое поле и регистрируют профиль зоны данного вещества с помощью детектирующей системы. Различие ширины зон, наблюдаемых без прерывания процесса и с таким перерывом, позволяет оценить скорость продольной диффузии.

Далее из наблюдаемых величин дисперсии пика можно вычислить коэффициент диффузии по формуле

$$D = \sigma^2 / 2t \quad (10.50)$$

Строго ламинарный характер течения жидкости в узких капиллярах исключает наличие вихревой диффузии. С другой стороны, плоский профиль скоростей по сечению капилляра, характерный для капиллярного электрофореза, практически полностью исключает вклад в диффузионное размывание электрофоретической зоны, связанный с параболическим профилем скоростей, характерным для пуазейлевского течения подвижной фазы, как это имеет место в хроматографии.

В капиллярном электрофорезе в большинстве случаев стремятся свести к минимуму адсорбционные взаимодействия разделяемых веществ со стенками капилляра, что позволяет свести к минимуму размывание зоны, связанное с сопротивлением массообмену.

Таким образом, продольная молекулярная диффузия оказывается, по существу, единственным диффузионным процессом, вызывающим размывание дискретных зон веществ в капиллярном электрофорезе.

10.3.2. Адсорбция

Адсорбционное взаимодействие анализируемых соединений со стенками применяемых капилляров в большинстве случаев вызывает дополнительное расширение пиков. Потому в большинстве вариантов капиллярного электрофореза стремятся, по возможности, уменьшить такие взаимодействия, хотя полностью их устранить обычно не удается. Из опыта жидкостной хроматографии известно, что поверхность кварцевого капилляра обладает достаточно высокой адсорбционной способностью, особенно по отношению к высокомолекулярным полярным соединениям типа белков и полипептидов. Вследствие нелинейности изотерм адсорбции наличие таких явлений неизбежно приводит к искажению формы пиков, снижению эффективности разделения и к существенным нарушениям результатов количественных определений. Значительная необратимая адсорбция может приводить к невозможности регистрации определяемого компонента детектором. С другой стороны, в ряде вариантов электрокинетической хроматографии адсорбционные явления с успехом используются для разделения достаточно сложных смесей определяемых компонентов.

В литературе описаны многочисленные приемы для подавления или, по крайней мере, существенного снижения адсорбции веществ на стенках стеклянных и кварцевых капилляров. Простейшим из этих способов является подбор буферного раствора с такой величиной рН, при которой анализируемое вещество и стенки кварцевого капилляра имеют одинаковый знак электрического заряда. В этом случае адсорбционные взаимодействия активно подавляются кулоновским отталкиванием. Так, например, при электрофоретическом разделении белков устанавливают рН буферного раствора выше их изоэлектрической точки, так что и анализируемые вещества, и стенки капилляра несут отрицательные заряды [23].

С другой стороны, при низких значениях рН буферных растворов подавляется диссоциация кислотных силанольных групп на поверхности кварцевых капилляров, что также существенно уменьшает адсорбционные взаимодействия [24]. Для уменьшения адсорбционных явлений широко используется также динамическое покрытие капилляров за счет различных добавок, вводимых в применяемые буферные растворы. Так, например, показано, что сульфат калия в концентрациях до 0,25М превосходит другие галогениды щелочных металлов в отношении подавления адсорбционных явлений и в то же время не мешает работе УФ-детекторов [25]. Для той же цели использовали высококонцентрированные фосфатные буферные растворы (до 0,5М) в комбинации с кварцевыми капиллярами малого диаметра (25 мкм). Описано применение для подавления адсорбции цвиттер-ионов, таких как, например, гидросульфонат триметиламмония или бетаин, которые, не изменяя существенно электропроводность переносящих электролитов, энергично взаимодействуют с активными адсорбционными центрами на поверхности кварца [26]. Для той же цели могут быть использованы диамины, например, такие

как 1,3-диаминопропан, 1,4-диаминобутан, и 1,5-диаминопентан. Кроме того, активно подавляют адсорбционные взаимодействия также и морфолин, катионные и неионные поверхностно-активные вещества (например, цетилтриэтиламмоний бромид или неионные поверхностно-активные вещества типа Твина различных марок).

Более сложные способы подавления адсорбционных явлений включают формирование пленки полимеров различной природы на внутренней поверхности кварцевых капилляров [27]. Для этой цели применяют бифункциональные соединения различной природы, которые одной из своих функциональных групп химически связываются с поверхностью кварца, в то время как вторая группа вступает в процесс полимеризации, ведущий к образованию иммобилизованной полимерной пленки.

К числу таких бифункциональных соединений относятся, например, γ -метакрилоксипропилтриметилсилоксан или винилтрихлорсилан. Метилсилоксановые группы или хлорные заместители реагируют с силанольными группами на поверхности кварца, а метакрилатные или винильные группы вступают в полимеризационный процесс с такими мономерами, как винилпирролидон и др., с образованием полимерной пленки, прочно экранирующей адсорбционные центры на поверхности кварца. Описаны также способы ковалентного связывания белков с поверхностью кварцевых капилляров с применением таких связывающих агентов, как 3-аминопропилтриэтоксисилан и глутаровый диальдегид [28].

Вклад адсорбции в общее расширение зоны может быть оценен по графику зависимости ВЭТТ σ^2/L от обратной величины напряженности электрического поля $1/E$ [29]. В отсутствие адсорбции такой график представляет собой прямую линию, соответствующую уравнению

$$H = \frac{\Delta x_0^2}{12L_D} + \frac{2D}{\mu_i} \times \frac{1}{E} \quad (10.51)$$

где Δx_0 – начальная ширина хроматографической зоны. Линейный характер этого графика указывает на практически полное отсутствие адсорбционных явлений, тогда как его искривление показывает заметное влияние адсорбции.

Прямые измерения адсорбции в капилляре могут быть выполнены следующим простым способом: пробу вводят в тот конец капилляра, где расположен детектор и накладывают электрическое поле, обеспечивающее движение электрофоретической зоны к противоположному концу капилляра. При этом детектор регистрирует начальную ширину и общую площадь полосы. В момент времени, когда эта полоса прошла 2/3–3/4 полной длины капилляра, полярность электрического поля меняют на противоположную. Зона вещества начинает продвигаться к детектору, который второй раз регистрирует соответствующий электрофоретический пик. Наличие искажений его формы и увеличение его ширины по сравнению с начальными параметрами указывают на влияние адсорбционных явлений, а сопоставление площадей двух зарегистрированных пиков позволяет выявить наличие необратимой сорбции вещества.

10.3.3. Электрофоретическая дисперсия

В капиллярном электрофорезе обычно анализируемую пробу вводят в капилляр, заполненный фоновым переносщим электролитом. При этом в капилляре формируются три четко разграниченные зоны с различным распределением концентраций: зона,

заполненная пробой; зона, заполненная фоновым электролитом впереди пробы и замыкающая зона фонового электролита. Первая из этих зон имеет две четкие границы – передний фронт и замыкающая граница. Фоновый электролит содержит коионы B^+ с тем же зарядом, как и у определяемого компонента анализируемой пробы и противоионы C^- , а проба содержит ионы определяемого компонента S^+ и те же противоионы.

При наложении электрического поля компоненты анализируемой пробы начинают двигаться в капилляре, сохраняя при этом конфигурацию компактной зоны. В том случае, если электрофоретическая подвижность ионов пробы S^+ меньше, чем подвижность коионов B^+ , т.е. $\mu_s < \mu_B$, электрическая проводимость зоны пробы будет меньше, чем проводимость зоны фонового электролита. Соответственно, в зоне пробы будет выше напряженность электрического поля. При этом скорость миграции ионов S^+ , проникающих в зону фонового электролита через переднюю границу зоны пробы (т.е. опережающих эту зону), будет уменьшена, и зона пробы в своем движении нагонит эти ионы. Это означает, что передний фронт пробы будет оставаться достаточно резким во все время миграции. Напротив, ионы S^+ , вышедшие за заднюю границу зоны пробы в замыкающую зону фонового электролита, будут двигаться с меньшей скоростью, чем зона пробы, и, следовательно, будут все более и более отставать от нее. Это приведет к размыванию заднего фронта и к формированию асимметричного пика на электрофорограмме.

Обратная ситуация будет иметь место, если электрофоретическая подвижность определяемого компонента пробы μ_s превышает подвижность коиона μ_B , т.е. $\mu_s > \mu_B$.

В этом случае электрическая проводимость в зоне пробы будет выше, чем в зоне фонового электролита, и, следовательно, напряженность поля в ней будет ниже. Тогда скорость миграции ионов S^+ , диффундирующих через передний фронт зоны пробы, будет увеличиваться. Эти ионы будут все более и более опережать зону пробы, что, естественно, приведет к размыванию ее переднего фронта.

В то же время ионы S^+ , диффундирующие через заднюю границу зоны пробы, будут ускоряться более сильным полем в замыкающей зоне фонового электролита, и вследствие этого будут нагонять зону пробы. Вследствие этого задний фронт зоны будет оставаться достаточно резким.

Только при равенстве электрофоретических подвижностей напряженность $\mu_s = \mu_B$ электрического поля будет одинаковой в зоне пробы и в зоне фонового электролита, и зона пробы будет оставаться симметричной, расширяясь с одновременным снижением максимальной концентрации ее компонентов под действием только диффузионных факторов.

Явление нарушения симметрии зоны пробы с ее одновременным расширением в процессе миграции по капилляру носит название **электрофоретической дисперсии**.

Диффузионное и электромиграционное расширение зоны примерно одинаковы при $C_s / C_B \approx 10^{-2}$. Если отношение C_s / C_B выше этой величины, т.е. при более высокой концентрации компонентов пробы, электрофоретическая дисперсия становится преобладающим фактором, определяющим расширение электрофоретической зоны и нарушение симметричности ее концентрационного профиля.

В приведенном анализе явления электрофоретической дисперсии предполагалось, что противоионы во вводимой пробе имеют одинаковые подвижности. На практике это соблюдается далеко не всегда, и подвижности коионов пробы и фонового электролита могут различаться весьма значительно. Однако установлено, что в том случае, когда

$C_s / C_b \leq 10^2$, подвижность и концентрация противоионов не оказывают заметного влияния на достигаемое разделение.

Более детальное рассмотрение явления электрофоретической дисперсии проведено в работах [29–32].

10.3.4. Влияние начальной ширины зоны вводимой пробы

В том случае, когда раствор анализируемой пробы вводится в капилляр в форме четко отграниченной зоны с прямоугольным распределением концентраций, дисперсия этого распределения может быть рассчитана по уравнению:

$$D = 0,1 \times \frac{C_s}{C_b} \times l \times v_s \quad (10.52)$$

где l – начальная ширина зоны (см).

При движении по капилляру распределение концентраций пробы постепенно приобретает форму гауссовой функции под действием диффузии. В типичных случаях, например, при использовании капилляров диаметром 75 мкм, обычно длина зоны вводимой пробы составляет 1–2 мм.

Показано [33], что вклад диффузии в расширение зоны пробы при ее движении по капилляру может быть описан следующим соотношением:

$$\sigma_s^2 = \frac{l^2}{12} \quad (10.53)$$

где l_d – эффективная длина капилляра от его начала до точки детектирования.

Легко подсчитать, что при типичных значениях времени миграции порядка 10 мин. и при обычных величинах коэффициентов диффузии диффузионное расширение зоны пробы составит 0,2–2,2 мм, что вполне сопоставимо с начальной шириной зоны вводимой пробы. В этих условиях достигаемое число теоретических тарелок равно

$$\Delta W_s = 2 \sqrt{2Dt} \quad (10.54)$$

Экспериментально установлено, что в отсутствие каких-либо специальных мер начальная ширина зоны пробы составляет всего 1% от общей дисперсии пиков при времени ввода пробы 0,2 с и достигает 98% при времени ввода пробы 15 с [34]. Для уменьшения влияния начальной ширины зоны прибегают к приему сжатия начальных зон анализируемых компонентов, которое осуществляется следующим образом.

В разделительный капилляр, заполненный переносящим буферным раствором (1), имеющим электропроводность k_1 , вводят относительно длинную пробку анализируемого раствора, представляющего собой буферный раствор (2) с существенно меньшей концентрацией ионов и, соответственно, с меньшей электропроводностью k_2 . Если первоначально введенная проба занимает часть длины капилляра x , то напряженности электрического поля в отрезках капилляра с пробой и с переносящим буфером могут быть выражены следующим образом:

$$E_1 = \frac{E_0}{\gamma x + (1 - x)} \quad (10.55)$$

$$E_2 = \frac{\gamma E_0}{\gamma x + (1 - x)} \quad (10.56)$$

где $\gamma = \frac{k_1}{k_2}$, т.е. отношение удельных проводимостей переносящего буфера и раствора пробы, а E_0 – первоначальное значение напряженности электрического поля в капилляре (до ввода пробы).

В связи с тем, что по условию эксперимента $k_1 > k_2$, $\gamma > 1$, отсюда следует, что электрическое поле в секции капилляра, заполненной переносящим буфером, будет

ослаблено в $\frac{1}{\gamma x + (1 - x)}$ раз, а поле в секции капилляра, заполненной раствором пробы, будет усилено в число раз, равное $\frac{\gamma}{\gamma x + (1 - x)}$ (10.57)

Легко подсчитать, что, например, в том случае, если удельная электропроводность раствора пробы в 100 раз меньше, чем удельная электропроводность переносящего буферного раствора, напряженность электрического поля в секции капилляра, заполненной раствором пробы, будет усилено в 9 раз, а в секции капилляра, заполненной переносящим буфером, – ослаблено в 11 раз. Если вводимая проба представляет собой низкоконцентрированный водный раствор, то величина γ может достигать нескольких сотен.

Вследствие более высокой напряженности поля в секции капилляра, занятой раствором пробы, ионы анализируемых веществ движутся более быстро по направлению к границе раздела пробы и переносящего буферного раствора. Как только ионы пробы пересекут эту границу, они попадают в зону действия более слабой напряженности электрического поля. Здесь скорость их движения снижается и происходит электрофоретическое разделение в соответствии с соотношением значений электрофоретической подвижности разделяемых компонентов.

В связи с тем что поток ионов, пересекающих границу раздела двух растворов, должен оставаться постоянным, а абсолютные скорости миграции ионов пропорциональны напряженности электрического поля, в непосредственной близости от этой границы раздела концентрация ионов пробы будет повышена в γ раз. При этом вследствие того, что общее количество ионов остается постоянным, ширина зоны, в которой распределены ионы пробы, должна во столько же раз уменьшиться, то есть должно произойти сжатие первоначально введенной пробы. Далее сформировавшиеся узкие зоны будут подвергаться электрофоретическому разделению. В обычных условиях капиллярного электрофореза, когда исходная проба вводится в конец капилляра, соединяемый с анодом, а детектор располагается вблизи его катодного конца, сжатию подвергаются зоны положительно заряженных ионов у передней границы зоны введенной пробы и отрицательные ионы у задней границы [35, 36].

Понятно, что неионные соединения, переносимые по капилляру действием электроосмотического потока, таким образом сжиматься и концентрироваться не будут, так что исходная ширина зоны будет вносить существенный вклад в конечную ширину наблюдаемых электрофоретических пиков.

Для того чтобы добиться существенного сжатия зон положительных и отрицательных ионов, подлежащие анализу вещества растворяют в том же буферном растворе,

который используется в качестве переносящей среды, однако разбавленном примерно в 10–15 раз. Конечно, пробу можно вводить и в любом другом растворе, однако его электропроводность должна быть в 10–15 раз меньше, чем у переносящего буфера.

Раствор пробы вводят гидродинамическим способом в капилляр через его анодный конец, т. е. так, чтобы образовать зону, примерно в 10 раз превышающую величину уширения ее под действием диффузии. При наложении электрического поля возникает электроосмотический поток, скорость которого заметно превышает скорость электрофоретической миграции разделяемых ионов в зоне переносящего электролита. Поэтому и положительные, и отрицательные ионы после сжатия зон выносятся к катодному концу капилляра и регистрируются детектором.

Следует заметить, что в той зоне капилляра, которая занята раствором пробы с низкой электропроводностью, напряженность электрического поля оказывается существенно выше, чем в остальной части капилляра. Поэтому, покинув зону раствора пробы, сжатые зоны компонентов пробы движутся значительно медленнее, чем в зоне пробы. В то же время, именно в этой части капилляра, заполненной переносящим буферным раствором, должно осуществиться их электрофоретическое разделение. Поэтому, когда электропроводность исходного раствора пробы очень низка (например, в 100 раз ниже электропроводности переносящего буферного раствора), возможна ситуация, когда ионы анализируемой смеси не успеют в достаточной степени разделиться до того момента, когда будут вынесены электроосмотическим потоком к детектирующему устройству. Из этого следует необходимость выбора оптимального соотношения электропроводностей раствора, пробы и переносящего буфера, которое обеспечивало бы интенсивное сжатие зон, с одной стороны, и их достаточное электрофоретическое разделение, с другой стороны [37].

Для того чтобы увеличить в возможно большей степени размер вводимой в капилляр пробы, прибегают к приему вытеснения буферного раствора пробы из капилляра электроосмотическим потоком после того, как уже произошел процесс сжатия зон ионов, подлежащих разделению [38, 39]. Для этого через несколько секунд после ввода пробы и наложения электрического поля меняют полярность электродов на время, достаточное для вытеснения 90–95% буфера пробы из капилляра. При этом, конечно, из капилляра будут удалены также и ионы, сконцентрированные у задней границы зоны первоначально введенной пробы.

Так, например, если проба введена гидродинамическим способом в анодный конец капилляра, то при сжатии зон катионы будут продвигаться к переднему фронту зоны пробы, а анионы к заднему фронту. При перемене полярности электрического поля электроосмотический поток будет направлен к аноду, т. е. к тому концу капилляра, через который была введена проба. При этом вначале сконцентрированные у задней границы зоны пробы положительные ионы, а затем и электролит, в котором были растворены подлежащие анализу компоненты пробы, будут вынесены из капилляра. Момент, когда электролит пробы будет почти полностью вынесен из капилляра, определяют по изменению протекающего через капилляр тока. По мере вытеснения электролита пробы, обладающего низкой электропроводностью, ток, протекающий через капилляр, возрастает. Когда его значение достигает 93–95% той величины, которая наблюдалась до ввода пробы, снова меняют полярность, и проводят разделение оставшихся в капилляре отрицательных ионов.

Для того чтобы аналогичным способом осуществить анализ смеси положительных ионов, необходимо изменить направление электроосмотического потока, т.е. изменить знак поверхностного заряда стенок капилляра. В случае кварцевых капилляров это можно сделать путем динамического покрытия их катионными поверхностно-активными веществами (например, такими как бромид цетилтриметиламмония или бромид ТТА в концентрации около 1 мМ). В этом случае при перемене полярности электрического тока из капилляра будут удалены вначале отрицательные ионы, а затем большая часть электролита пробы.

Такой прием позволяет увеличить величину анализируемой пробы в несколько сотен раз, заполняя ею до $2/3$ длины применяемого капилляра. В общем, максимально возможная при данных условиях длина капилляра, занятая зоной пробы, отвечает соотношению электрофоретической подвижности определяемого иона и скорости электроосмотического потока.

Описан ряд модификаций рассмотренного процесса сжатия начальных зон анализируемой пробы. Эти приемы направлены на достижение возможно более полного разделения компонентов наряду со значительным увеличением чувствительности определения, т.е. снижения предельно детектируемых количеств определяемых компонентов [40, 41]. Так, предложено до ввода пробы вводить в капилляр небольшую зону чистой воды или слабо проводящего электролита [40]. Рекомендуется вводить пробу электрокинетическим методом в течение 30 с при напряжении 5 кВ или 5 с при напряжении 30 кВ. Показана возможность применения переносящего электролита с более высокой подвижностью, чем анализируемые ионы. При очень низких концентрациях ионов пробы (порядка 10^{-9} М) и при концентрациях переносящего электролита порядка 5–20 мМ при этом достигается значительное обогащение пробы и сжатие соответствующих зон по механизму изотахофореза [41]. Более детальное описание механизма и технических приемов сжатия проб можно найти в руководствах [6–10].

Здесь важно отметить, что именно возможность значительного сжатия начальных зон ионов пробы при отсутствии собственных хроматографии факторов диффузионного расширения зон определяют исключительно высокую разделяющую способность метода капиллярного электрофореза, обеспечившую этому методу широчайшую область применения.

Однако существует весьма важный фактор, который оказывает крайне отрицательное влияние на процесс электрофоретического разделения. Этот фактор представляет собой джоулево тепло, выделяющееся при прохождении электрического тока через заполненный электролитом капилляр и нагревающее электролит. Роль и значение этого фактора и пути устранения его негативного влияния будут рассмотрены в следующем разделе.

10.3.5. Джоулево тепло

Как всякий проводник, через который протекает электрический ток, капилляр, заполненный токопроводящим электролитом, при наложении электрического поля поддается нагреву. При этом повышается температура внутри капилляра, что, в свою очередь, вызывает соответствующие изменения вязкости электролита и искажение плоского профиля скорости электроосмотического потока. Как в любом проводнике электрического тока, мощность, W , выделяющаяся в капилляре при прохождении электрического тока, равна

$$W = UJ = RJ^2 = \frac{U^2}{R} \quad (10.58)$$

где J – сила тока, U – приложенное напряжение, а R – электрическое сопротивление проводника.

С другой стороны, тепловая мощность, W , выделяющаяся в капилляре на единицу объема при приложении электрического поля, может быть выражена следующим уравнением:

$$W = E^2 \times \Delta \times C \times \varphi \quad (10.59)$$

где E – напряженность поля (В/см), Δ – эквивалентная проводимость раствора переносщего электролита (см²/Ом×моль), C – концентрация электролита (моль/л), а φ – параметр пористости среды в капилляре, равный для полого капилляра единице.

При типичных значениях параметров капиллярного электрофореза ($E = 300$ В/см; $\Delta = 150$ см²/Ом×моль; $C = 50$ мМ) можно видеть, что $W = 675$ Вт/см³. При длине капилляра ~ 60 см и его внутреннем диаметре 75 мкм количество джоулевого тепла, выделяющегося в нем, составит 1,7 Вт.

Было установлено, что при выделяемой в капилляре мощности менее 3 Вт абсолютная температура электролита может быть подсчитана по эмпирической формуле

$$T = 11,5W + 298 \quad (10.60)$$

При этом можно полагать, что при величине рассеиваемой в капилляре мощности 0,1 Вт температура электролита повышается на 1,1 К при воздушном охлаждении капилляра путем естественной конвекции и на 0,6 К при принудительном воздушном охлаждении. Так, при токе порядка 50 мкА увеличение температуры в капилляре составит около 11 К [8]. Джоулево тепло отводится из центральных зон капилляра через периферийные слои электролита, через стенки капилляра и через окружающую капилляр среду. Разница температур электролита в центре капилляра и у его стенки пропорциональна квадрату его внутреннего диаметра, d_{in} :

$$\Delta t = \frac{W \times d_{in}^2}{16 K} \quad (10.61)$$

где K – теплопроводность электролита (Вт/см, °С). Для воды теплопроводность равна 6×10^{-3} Вт/см, °С. Большинство органических растворителей имеет в несколько раз меньшую теплопроводность, например, для метанола $K = 1 \times 10^{-3}$ Вт/см, °С, тогда как стекло и кварц, из которых чаще всего изготавливают капилляры, имеют теплопроводность в 1,5–2 раза большую [$(1-1,5) \times 10^{-2}$ Вт/см, °С].

С другой стороны, теплопроводность воздуха равна $2,5 \times 10^{-4}$ Вт/см, °С, т. е. более чем в 20 раз меньше, чем у водного раствора. Именно это и создает наибольшее термическое сопротивление отводу тепла из капилляра. Скорость теплоотвода увеличивается при увеличении скорости воздушного потока, что иллюстрирует рис. 10.5.

Применение жидкостного (водяного) охлаждения капилляра позволяет еще уменьшить различия температуры между центральными и периферийными областями капилляра. Неравномерность температурного поля внутри капилляра приводит к целому



Рис. 10.5. Разница температур в центре и у стенки капилляров разных диаметров при естественной конвекции окружающего воздуха и при принудительном обдуве [37]: 1 – естественная конвекция; 2 – 4 – принудительный обдув при скорости потока 2–0.1 м/с; 3 – 1.0 м/с; 4 – 10 м/с

ряду нарушений нормального электрофоретического процесса, наиболее важными из которых являются следующие.

Ранее было указано, что величина электроосмотического потока μ_{eo} обратно пропорциональна вязкости жидкости, которая в свою очередь зависит от температуры экспоненциально:

$$\eta = C \times e^{\frac{E_A}{RT}} \quad (10.62)$$

где C – константа; E_A – энергия активации вязкого течения; R – универсальная газовая постоянная (8,314 Дж/моль \times °C).

Отсюда следует, что с ростом температуры вязкость жидкости уменьшается примерно на 2% на 1 градус. Соответственно меняется и скорость электроосмотического потока:

$$\mu_{eo} = C' \times e^{\frac{A}{RT}} \quad (10.63)$$

где C' – константа пропорциональности.

Как следствие, наличие разницы температур в центральной и периферической областях капилляра приводит к искажениям плоского фронта скоростей электроосмотического потока, что неизбежно влечет за собой расширение электрофоретических зон, то есть снижение эффективности разделения.

Кроме того, изменения температуры влекут за собой и изменения ионной силы и подвижности самих разделяемых веществ, что также увеличивает электрофоретическую дисперсию. При наличии адсорбционных явлений в капилляре с изменением температуры меняются также коэффициенты распределения между фазами и кинетические параметры сорбционных процессов.

Таким образом, наличие значительных неоднородностей температурных полей в капилляре приводит к резкому ухудшению разделяющей способности системы. Поэтому одно из главных условий достижения высокой эффективности процесса электрофоретического разделения веществ заключается в обеспечении как можно меньших различий в температурах центральной и периферической зон применяемого капилляра. До-

пустимыми границами здесь можно считать различия температур, не превышающие 5–7 градусов.

Показано [42], что вклад термических эффектов в высоту, эквивалентную теоретической тарелке, не превышает 0,1 от вклада продольной диффузии при условии

$$d_{in}^3 \times E \times C > 3,3 \times 10^9 \quad (10.64)$$

где d_{in} – внутренний диаметр капилляра (мкм), E – напряженность электрического поля (В/мм) и C – мольная концентрация электролита в капилляре.

Это условие выполняется при концентрации переносящего электролита 0,01М и напряженности поля 30–50 В/мм для капилляров диаметром до 250–140 мкм, что обычно и считается их верхней границей.

Одновременно выделение джоулева тепла ограничивает и применяемые величины напряженности поля, так как при слишком большом напряжении возможен сильный разогрев и даже вскипание переносящего электролита, особенно в тех случаях, когда анализируемую пробу вводят в виде очень сильно разбавленного раствора.

Таким образом, необходимость интенсивного отвода тепла определяет необходимость применения в капиллярном электрофорезе капилляров малого диаметра, что, естественно, ограничивает достигаемую чувствительность метода и препятствует его применению для препаративного разделения сколько-нибудь значительных количеств веществ. Тем не менее достигаемые с его помощью аналитические результаты столь многообразны и эффективны, что этот метод уже занял важную позицию среди других аналитических методов, и его значимость будет, несомненно, все более и более возрастать в будущем.

10.4. Капилляры

В настоящее время наиболее часто применяемым материалом для изготовления капилляров, используемых в капиллярном электрофорезе, являются кварцевые капилляры, покрытые слоем полиимидного лака. Известны также примеры применения для этой цели капилляров, выполненных из стекла (Пирекс) и из фторопласта (Тефлон). Широкое применение кварцевых капилляров связано с рядом присущих плавленому кварцу свойств. Наиболее существенными для применения в капиллярном электрофорезе свойствами этих материалов являются высокая механическая прочность, большая теплопроводность кварца и его прозрачность в УФ-диапазоне, что обеспечивает широкие возможности для детектирования разделенных фракций. Из плавленого кварца могут быть изготовлены капилляры диаметром от нескольких микрометров до 0,5 мм и более. В капиллярном электрофорезе наиболее часто применяются кварцевые капилляры длиной от 0,5 до 1 м с внутренним диаметром 10–150 мкм при внешнем диаметре от 200 до 360 мкм. Наличие внешнего полиимидного покрытия значительно увеличивает прочность кварцевых капилляров, что существенно облегчает работу с ними.

Внутренняя поверхность кварцевого капилляра, заполненного буферным раствором (переносящим электролитом), обычно несет группы $=SiOH$, имеющие слабо кислотный характер. В условиях капиллярного электрофореза это определяет направление электроосмотического потока от анода к катоду. Описаны многочисленные процедуры модификации внутренней поверхности кварцевых и стеклянных капилляров, позволяющие изменить знак поверхностных зарядов на противоположный и таким образом поменять

направление электроосмотического потока. Эти процедуры детально описаны в ряде руководств по капиллярному электрофорезу и во многих оригинальных публикациях [6–10]. Внешнее полиимидное покрытие кварцевых капилляров практически непрозрачно для УФ-излучения. Поэтому для осуществления детектирования разделенных фракций полиимидное покрытие удаляют на длине 1–3 мм вблизи конца капилляра, ближайшего к катоду. Эту операцию проводят либо механически, соскабливая полиимидное покрытие, либо нагревая небольшой участок капилляра в газовом пламени. Эта операция также подробно описана в многочисленных руководствах. Некоторые фирмы поставляют специально для капиллярного электрофореза кварцевые капилляры с полимерным покрытием, прозрачным для УФ-излучения [43]. Имеются также сообщения о применении стеклянных капилляров прямоугольного сечения с размерами 20×200, 30×300, 50×50, 50×500 и 100×100 мкм [44]. Такие капилляры облегчают применение УФ-детектирования, но оказываются весьма непрочными и требующими очень осторожного обращения. Их преимуществом, помимо легкости УФ-детектирования, является повышенная способность к рассеиванию выделяющегося джоулева тепла, что позволяет работать с повышенными напряженностями поля и с увеличенными объемами пробы. Это, соответственно, позволяет заметно увеличить чувствительность определения, особенно в области малых концентраций анализируемых компонентов.

Рекомендуется использовать отдельные капилляры для работы в узком интервале рН, не превышающем 2 единиц (например, один капилляр – в диапазоне рН 2–4, второй – в диапазоне 4–6 и т.д.). Для повышения воспроизводимости времен миграции рекомендуется следующая последовательность операций:

- промывка 0,1 М раствором гидроксида натрия в течение 5 мин;
- промывка бидистиллированной водой в течение 2 мин;
- промывка переносщим буферным раствором в течение 10 мин.

Хранить подготовленные капилляры предпочтительно в сухом виде.

В ряде случаев оказывается необходимой модификация внутренней поверхности кварцевых и стеклянных капилляров путем нанесения на нее различных покрытий. Чаще всего целью такой модификации оказывается уменьшение интенсивности взаимодействия разделяемых веществ с силанольными группами на поверхности кварца. В других случаях, напротив, такое покрытие выполняет функцию хроматографической неподвижной фазы, так что разделение происходит, в основном, за счет различий в характере сорбционных взаимодействий разделяемых веществ и нанесенной неподвижной фазы. Такие процессы, обычно относимые к электрокинетической хроматографии, кратко рассмотрены в следующем разделе.

Модификация поверхности кварцевых и стеклянных капилляров может быть проведена динамическим способом. Для этой цели к переносщему буферному раствору добавляют соответствующие модификаторы (поверхностно активные вещества; цвиттер-ионные соединения или гидрофильные полимеры), активно адсорбирующиеся на поверхности капилляра. Такой способ модификации отличается простотой выполнения, однако далеко не всегда дает воспроизводимые результаты.

Более надежной оказывается модификация путем химической привязки модификатора к силанольным группам на поверхности стекла или кварца. Такая химическая привязка модифицирующих агентов может быть осуществлена с применением полиакриламидного геля [45–47], диметилоктадецилхлорсилана [48], эпоксидного полимера

[49], полиэтиленimina [50], полиэтиленгликоля [51, 52]. Описаны способы модификации поверхности капилляров путем обработки их водными растворами протеинов [58] и углеводов [59].

Как правило, модификация поверхности капилляров приводит к уменьшению электроосмотического потока, а в ряде случаев и к его обращению. Это создает весьма широкие возможности для варьирования условий капиллярного электрофореза применительно к решаемой аналитической задаче.

Для удобства размещения в приборах для электрофореза часто кварцевые и тонкие стеклянные капилляры сворачивают в кольцо или в спиральную бухту. Эта операция может приводить к существенному снижению эффективности разделения. Так, по данным работы [60], эффективность заполненных гелем капилляров диаметром 75 мкм, равная для прямого капилляра 10^7 т.т./м, при свертывании в спираль снижалась в 3 раза, тогда как эффективность полого капилляра того же диаметра ($2 \cdot 10^6$ т.т./м) при свертывании в спираль заметно не менялась.

Совокупность имеющихся в настоящее время данных позволяет предположить, что в будущем значение фторопластовых и стеклянных капилляров может существенно возрасти.

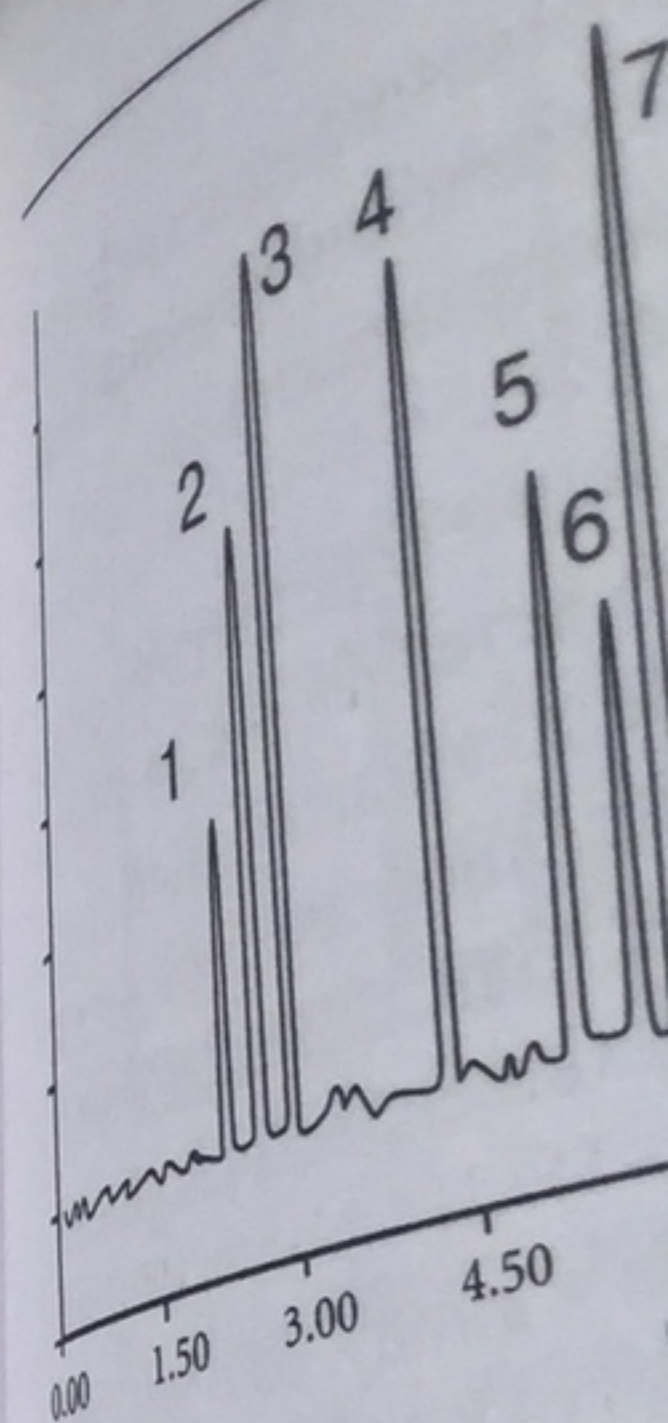
10.5. Методы электрохроматографии

В ряде вариантов метода капиллярного электрофореза для разделения анализируемых веществ используют межмолекулярные взаимодействия, аналогичные применяемым в хроматографической технике (адсорбция, абсорбция, гель-фильтрация). При этом сорбционный материал (неподвижная фаза) может быть закреплен на стенках капилляра, либо может заполнять весь его объем, или может присутствовать в переносящем электролите в форме достаточно крупных молекулярных образований (мицелл или агрегатов полимерных молекул).

Важным преимуществом методов электрохроматографии является возможность разделения неионных соединений, как и в высокоэффективной жидкостной хроматографии. При этом в полной мере используются такие преимущества метода капиллярного электрофореза, как плоской фронт скоростей подвижной фазы, простота применяемой аппаратуры, малый расход подвижной фазы и очень высокая эффективность достигаемого разделения.

10.5.1. Электрохроматография

Этот процесс в значительной степени аналогичен высокоэффективной хроматографии, рассмотренной в главе 6, с тем различием, что движение подвижной фазы осуществляется под действием электроосмоса, а не благодаря работе жидкостного насоса. Вследствие выделения джоулева тепла диаметр хроматографического капилляра в этом методе ограничен величиной примерно 200 мкм. Разделение может осуществляться благодаря адсорбции на стенках капилляра, активированных путем соответствующей химической обработки либо вследствие сорбции на заполняющем капилляр подходящем сорбционном материале. В опубликованных до настоящего времени работах по электрохроматографии для этой цели, в основном, используется силикагель с частицами размером 1–1,5 мкм и менее [61]. При этом интересно отметить, что даже силикагель с химически привитыми октадецильными группами содержит на поверхности до-



статочное количество. В капиллярах, заполненных гелем, поток при пропускании на то, что ξ -потенциал поверхности кварца направляет в слое потока в 1,5–2 раза

Приготовление колонки для работ [62, 63] колонки для высок

Результаты пробы, из которых наибольшее приложенное напряжение. В диапазоне напряжений незначительное повышение. В то же время при напряжении существенно повышается. Работы считаются оптимальными при применении электрохроматографии на рис. 10.6 [8].

Детальное описание величин зернистости хроматографии пр

10.5.2. Мицеллярная электрохроматография

Мицеллярная электрохроматография — это метод, основанный на использовании мицелл в качестве подвижной фазы. Принцип действия достаточно прост: в качестве неподвижной фазы используется силикагель, а в качестве подвижной фазы — раствор с мицеллами. При этом происходит разделение веществ в зависимости от их способности взаимодействовать с мицеллами.

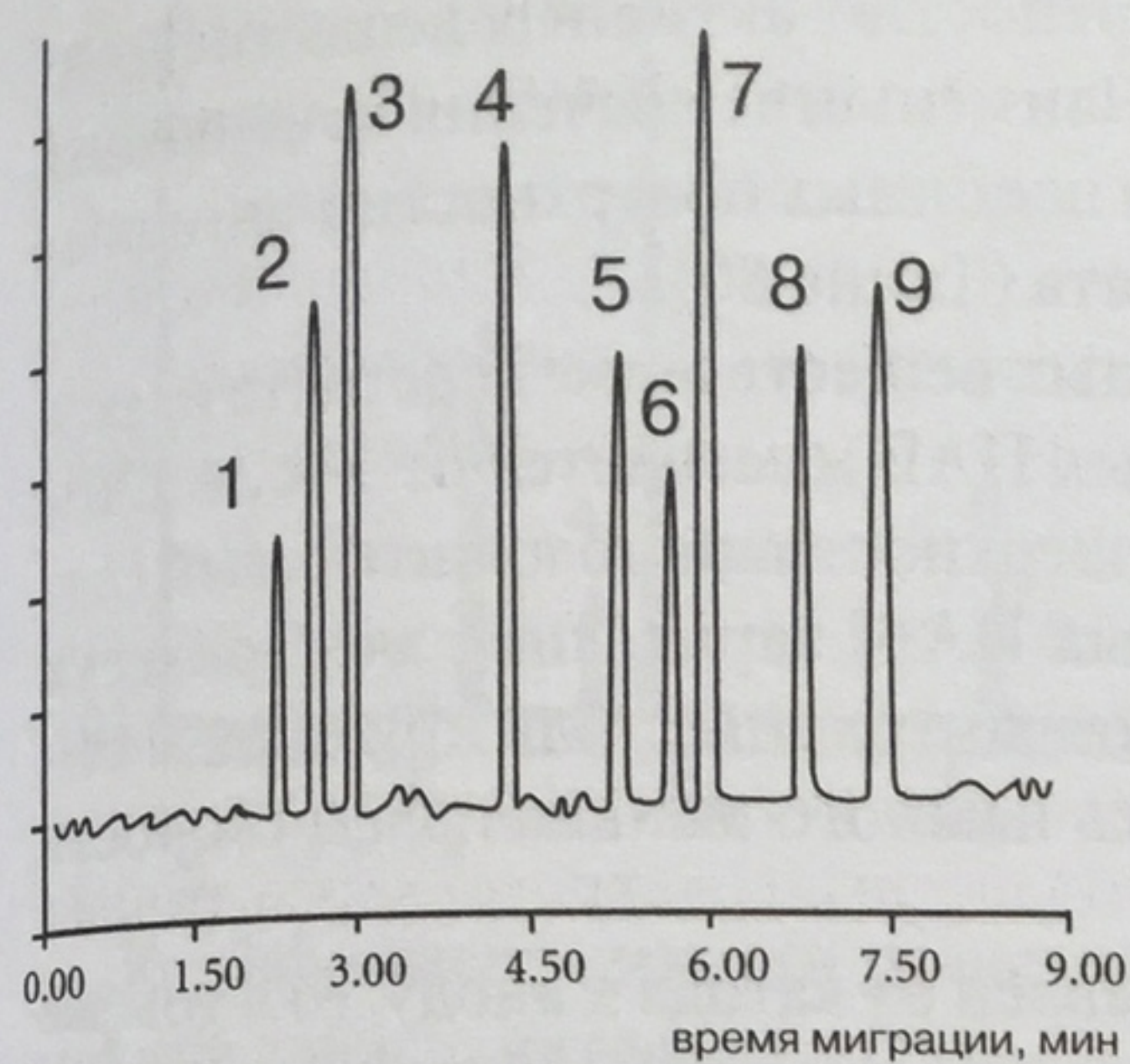


Рис. 10.6. Разделение смеси ароматических соединений методом обращенно-фазовой электрохроматографии на кварцевой колонке размером $285 \text{ мм} \times 50 \text{ мкм}$, заполненной адсорбентом Гиперсил с величиной зерна 3 мкм : 1 – тиомочевина; 2 – бензиловый спирт; 3 – бензальдегид; 4 – бензол; 5 – 1,2-дихлорбензол; 6 – 1,2,3-трихлорбензол; 7 – 1,2,3,4-тетрахлорбензол; 8 – пентахлорбензол; 9 – гексахлорбензол. Электрокинетический ввод пробы (2,5 кВ, 5 с), напряжение 45 кВ, ток 2 мкА. Подвижная фаза – смесь 0,002 М раствора тетрабората натрия с ацетонитрилом (1:4), pH 8.7

статочное количество силанольных групп для создания электроосмотического потока. В капиллярах, заполненных мелкозернистым силикагелем, скорость электроосмотического потока при прочих равных условиях оказывается меньше, чем в полых, несмотря на то, что ξ -потенциал на поверхности силикагеля имеет ту же величину, что и на поверхности кварца. Однако меньший размер каналов и беспорядочное, хаотичное их направление в слое адсорбента приводят к снижению скорости электроосмотического потока в 1,5–2 раза [62].

Приготовление капиллярных колонок для электрохроматографии подробно описанное в работах [62, 63], в основном, включает те же операции, что и процесс заполнения колонок для высокоэффективной жидкостной хроматографии (см. гл. 7).

Результаты процесса электрохроматографии зависят от целого ряда факторов, среди которых наиболее важны pH и ионная сила раствора (переносящего электролита), приложенное напряжение, наличие органических модификаторов в составе электролита. В диапазоне концентраций электролита от $4 \cdot 10^{-5}$ до 0,2 М наблюдается довольно незначительное влияние этого параметра на величину электроосмотического потока. В то же время при повышенных концентрациях переносящего электролита существенно повышается эффективность разделения. Для боратного буферного раствора считается оптимальным диапазон концентраций 2–4 мМ. Показательный пример применения электрохроматографии для разделения неионных соединений приведен на рис. 10.6 [8].

Детальное обсуждение вопросов расширения зон влияния термических эффектов и величины зерна применяемого сорбента на эффективность разделения в электрохроматографии приведено в работах [37, 61, 62].

10.5.2. Мицеллярная электрокинетическая хроматография

Мицеллярная электрокинетическая хроматография представляет собой такую модификацию метода капиллярного электрофореза, которая позволяет осуществить высокоэффективное разделение неионизирующихся, электрически нейтральных молекул.

Принцип этого метода разделения достаточно прост. Мицеллы представляют собой достаточно крупные молекулярные образования, образующиеся в водном растворе при некоторой концентрации поверхностно-активного вещества. Наименьшая концентрация его, при которой начинается образование мицелл, называется критической кон-

центрацией мицеллообразования. Для разных поверхностно-активных веществ (ПАВ) эта концентрация составляет от 10^{-5} до $1,4 \times 10^{-2}$ М. Наименьшие значения критической концентрации мицеллообразования характерны для неионных поверхностно-активных веществ типа полиэтиленгликольсорбитанмоноолеата (Твина 80).

Отдельная мицелла разных поверхностно-активных веществ может состоять из разного числа отдельных молекул. Это число для разных ПАВ изменяется от 3–4 до 130 и более. В зависимости от типа ПАВ мицеллы несут поверхностный положительный (для катионных ПАВ) или отрицательный (для анионных ПАВ) заряд, либо электрически нейтральны. Однако скорость электрофоретической миграции столь крупных молекулярных образований весьма невелика, оказываясь намного меньшей, чем скорость электроосмотического потока.

Поэтому, если электроосмотический поток направлен от катода к аноду, то в том же направлении перемещаются и мицеллы. Если в раствор, содержащий ПАВ в мицеллярной форме, ввести смесь подлежащих разделению веществ, то они распределяются между гидрофобной мицеллярной средой и водной фазой в соответствии с индивидуальными коэффициентами распределения k . При этом медленно движущиеся в электрическом поле крупные мицеллярные образования играют роль хроматографической неподвижной фазы по отношению к молекулам разделяемых веществ, продвигающихся в водной фазе с существенно большей скоростью электроосмотического потока. По-существу при этом реализуется процесс **обращенно-фазовой хроматографии**, в которой мицеллы ПАВ выполняют роль псевдостационарной фазы. При этом чрезвычайно малые размеры мицелл определяют очень высокую скорость установления равновесия. Отсутствие других размывающих факторов и малая величина продольной диффузии определяют очень высокую эффективность такого хроматографического процесса. Пример разделения неионизирующихся соединений с помощью этого метода приведен на рис. 10.7.

Понятно, что наименьшее время удерживания в таком хроматографическом процессе $t_0 = t_{eo}$ будет иметь такой компонент, который совершенно не взаимодействует с мицеллами и, следовательно, продвигается в капилляре со скоростью электроосмотического потока. С другой стороны, наибольшее возможное время удерживания равно времени электрофоретической миграции мицелл, t_m . Все прочие вещества будут иметь времена удерживания в интервале от t_m до t_{eo} . Коэффициент емкости компонента i в данной системе k , может быть рассчитан из времен миграции электроосмотического потока t_{eo} по следующей формуле [59]:

$$k = \frac{t_i - t_{eo}}{t_{eo} \times \left(1 - \frac{t_i}{t_m}\right)} \quad (10.65)$$

Легко видеть, что при бесконечно большом времени миграции мицелл, $t_m \rightarrow \infty$, эта формула преобразуется в обычное для жидкостной хроматографии выражение для коэффициента емкости, в котором величина t_{eo} играет роль времени удерживания несорбирующегося компонента. В том случае, когда разделению подвергаются вещества, способные к ионизации, на хроматографический механизм накладывается электрофоретическое разделение [60]. При этом результирующая подвижность иона разделяемого соединения определяется как средневзвешенная величина подвижности мицелл и собственной подвижности определяемого соединения.

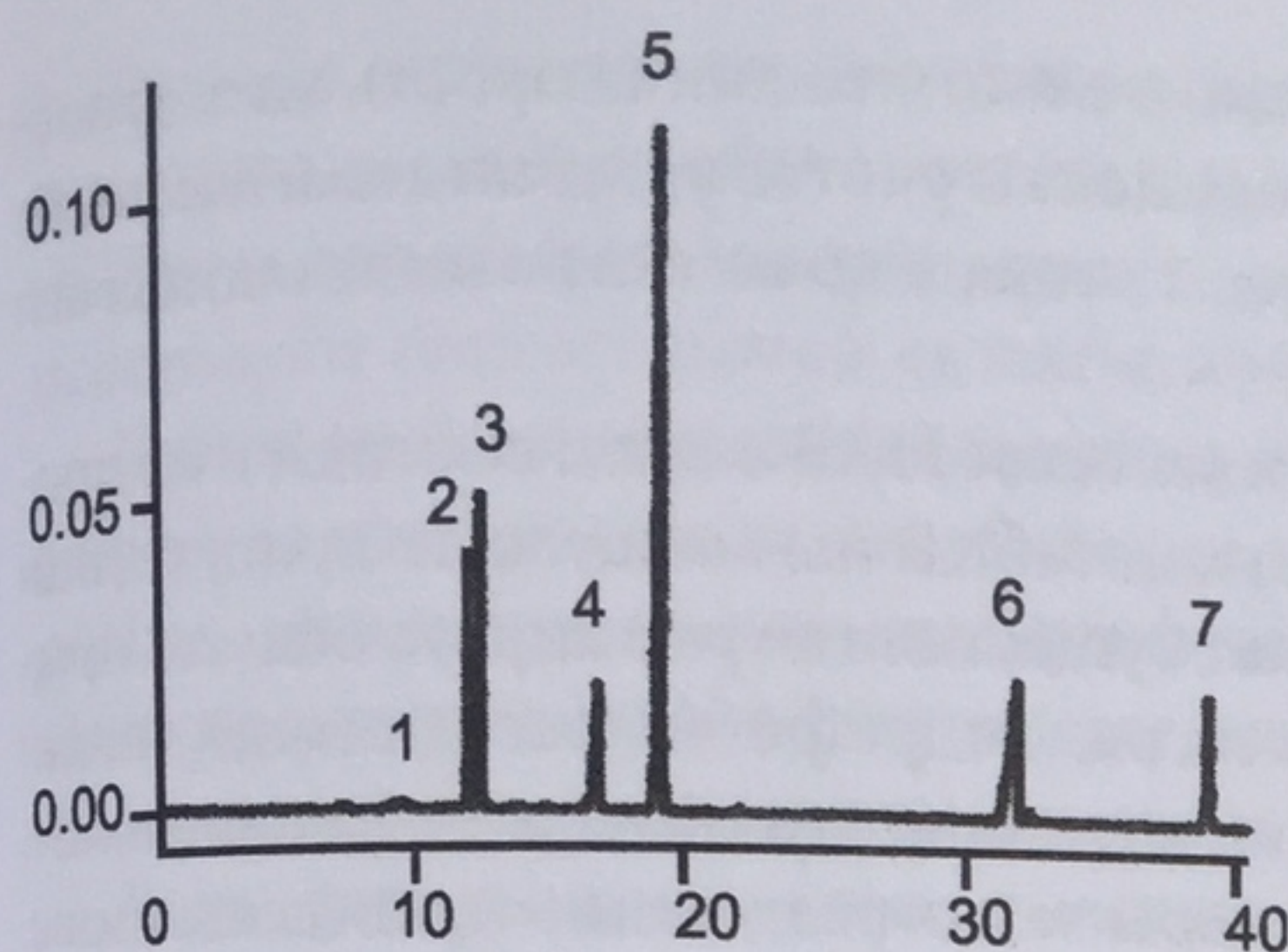


Рис. 10.7. Разделение смеси неионизирующихся веществ методом мицеллярной электрокинетической хроматографии: 1 – метанол, не взаимодействующий с мицеллами и выполняющий функцию несорбирующегося компонента; 2 – фенол; 3 – бензиловый спирт; 4 – бензол; 5 – нитробензол; 6 – толуол; 7 – краситель Судан III, перемещающийся вместе с мицеллами. Прибор Бекман Р/АСЕ 2000, кварцевый капилляр размером 57 см × 75 мкм, гидродинамический ввод пробы в течение 1 с; напряженность поля 263 В/см; температура 25°C; УФ-детектирование при длине волны 214 нм; переносающий электролит – фосфатный буфер (29 мМ) с добавкой додецилсульфоната натрия (50 мМ), pH 8

Коэффициент емкости разделяемого вещества связан с концентрацией мицелл линейной зависимостью:

$$k = K \times V([S] - C_{kp}) \quad (10.66)$$

где K – коэффициент распределения в растворе, V – мольный объем ПАВ, $[S]$ – мольная концентрация ПАВ в растворе, C_{kp} – критическая концентрация мицеллообразования (моль/л). Это уравнение выполняется при низких концентрациях как ионизирующихся, так и неионизирующихся веществ.

Степень разделения двух близких пиков в мицеллярной хроматографии можно оценить, подставив уравнение (10.66) в обычное хроматографическое уравнение для этого параметра:

$$R = \frac{\sqrt{n}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k_2}{1 + k_2} \times \frac{1 - \frac{t_{eo}}{t_m}}{\left[1 + \frac{t_{eo}}{t_m} \times k_1\right]} \quad (10.67)$$

Из этого уравнения следует, что для увеличения степени разделения весьма

желательно по возможности уменьшить соотношение $\frac{t_{eo}}{t_m}$. Это может быть достигнуто путем уменьшения или даже полного подавления электроосмотического потока с помощью введения в переносающий электролит органических модификаторов или путем соответствующего покрытия стенок капилляра. Вопросы оптимизации концентрации ПАВ в условиях кинетической мицеллярной хроматографии рассмотрены в работе [61].

В качестве мицеллообразующих ПАВ в мицеллярной хроматографии применяют катионные, анионные и неионные соединения. Каждая из этих групп ПАВ имеет свои особенности и свою область применения. Так, ПАВ типа додецилсульфоната натрия образуют осадки с солями щелочноземельных металлов. Поэтому такие соли не должны входить в состав переносающих буферных растворов. Хлорид цетилтриметиламмония способен адсорбироваться на стенках кварцевых и стеклянных капилляров, что приводит к изменению поверхностного заряда и, как следствие, к обращению направления электроосмотического потока. Последний в этом случае направляется от катода к аноду, тогда как мицеллы мигрируют от анода к катоду [8].

Ряд преимуществ имеет применение неионных и цвиттерионных ПАВ [62]. Так, введение в переносающий электролит октилгликозида и 3-(3-холамидопропил)-диметилам-

монио-3-пропансульфоната оказывает лишь малое влияние на скорость электроосмотического потока, не влияет на электропроводность раствора и, следовательно, не изменяет величину протекающего через электролит тока и количество выделяющегося джоулева тепла.

Весьма плодотворным оказалось применение в качестве ПАВ желчных кислот и их производных [63]. Эти природные соединения образуют стабильные мицеллы в присутствии многих органических растворителей, что позволяет существенно расширить область применимости метода капиллярного электрофореза на ряд гидрофобных соединений, плохо растворимых в воде. Желчные кислоты оптически активны, что позволяет использовать их для разделения энантиомеров. Некоторые примеры таких разделений приведены ниже. Влияние ионной силы и pH переносящего буфера, температуры, различных модифицирующих добавок на результаты мицеллярной электрокинетической хроматографии подробно рассмотрено в ряде монографий по капиллярному электрофорезу.

Несмотря на известную ограниченность возможностей электрокинетической мицеллярной хроматографии, связанной с ограниченным интервалом времен удерживания между t_{eo} и t_{MC} , с помощью этого метода удастся достигать весьма высоких значений эффективности разделения, превышающих 500 000 т.т., при использовании капилляров длиной всего 40–50 см. Эти возможности делают метод электрокинетической мицеллярной хроматографии одним из самых высокоэффективных методов в настоящее время и открывают весьма широкие и привлекательные перспективы в будущем.

10.5.3. Капиллярный гель-электрофорез

В том случае, когда подлежащие разделению вещества ионного характера имеют близкие значения плотности заряда, т.е. сходные величины отношения заряда к массе, их разделение с помощью зонного электрофореза в полых капиллярах становится весьма затруднительным или вообще невозможным. Однако в этих случаях можно добиться разделения таких веществ на основе различий в величине их молекул. При этом используются молекулярно-ситовые свойства заполняющего капилляр геля с контролируемыми размерами пор гелевой сетчатой структуры.

Наиболее развитой областью применения такого методического варианта капиллярного электрофореза является разделение нуклеиновых кислот, синтетических олигонуклеотидов, фрагментов ДНК с различной длиной цепи, включая высокомолекулярные фракции, а также способных к ионизации олигосахаридов и полисахаридов. Соединения этих групп имеют очень близкие значения плотности заряда и не поддаются электрофоретическому разделению в полых капиллярах.

Теоретическая трактовка процесса разделения в заполненных гелем капиллярах предполагает его молекулярно-ситовый механизм. При этом структура геля рассматривается как молекулярное сито с порами разного размера, а разделяемые молекулы – как недеформируемые сферические частицы разного размера [64]. Ясно, что молекулы меньшей величины могут мигрировать в структуре геля быстрее, так как для перемещения доступно большее число каналов.

Альтернативная модель такого процесса предполагает, что молекулярная цепь разделяемых макромолекул много больше, чем размер пор молекулярно-ситовой структуры геля, так что макромолекулы мигрируют через узкие поры гелевой структуры подобно змее, проползающей в узкую нору [65].

Гелевые структуры в капиллярах формируют путем полимеризации акриламида в присутствии сшивающих агентов, таких как N, N-метиленбисакриламид. При этом формируется гель со средним размером пор от 2 до 8 нм [66]. Кроме того, достаточно широко используют гели агарозы в ее нативной форме и в виде различных модификаций.

Одной из быстро развивающихся модификаций техники капиллярного гель-электрофореза является разделение макромолекул в среде растворов различных водорастворимых полимеров, выполняющих функцию «жидкого молекулярного сита». В качестве таких полимеров используют гидроксиметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, декстраны с молекулярной массой порядка 100 тыс. а.е.м, [67–69].

Результаты, получаемые с помощью метода капиллярного гель-электрофореза, в принципе сходны с результатами гель-проникающей (ситовой) жидкостной хроматографии. Однако этот последний метод вследствие ряда причин фундаментального характера не позволяет добиться достаточно высокой эффективности разделения и поэтому не причисляется к высокоэффективным хроматографическим процессам. Напротив, метод капиллярного гель-электрофореза обеспечивает эффективность разделения до 1 млн. теор. тарелок и более даже при длине капилляра порядка 0,5 м. При этом оказывается возможным, например, провести полное разделение более 400 полимер-гомологов поли-(уридин-5'-фосфата) с числом мономерных звеньев от 1 до 431 [70]. Такие результаты по справедливости обеспечивают данной модификации капиллярного электрофореза прочное место среди других высокоэффективных методов анализа и разделения веществ.

10.6. Примеры применения метода капиллярного электрофореза

Ниже приведено несколько достаточно показательных примеров, иллюстрирующих исключительно богатые возможности метода капиллярного электрофореза при разделении близких по свойствам веществ и многокомпонентных смесей. Получаемые при этом электрофорограммы, приведены на рис. 10.8–10.17 в порядке усложнения решаемых аналитических задач [71–78]. Понятно, что эти примеры не исчерпывают все многообразие задач разделения, решаемых с помощью метода капиллярного электрофореза, однако они имеют целью дать читателю представление о весьма широких возможностях этой изящной и исключительно эффективной техники разделения веществ.

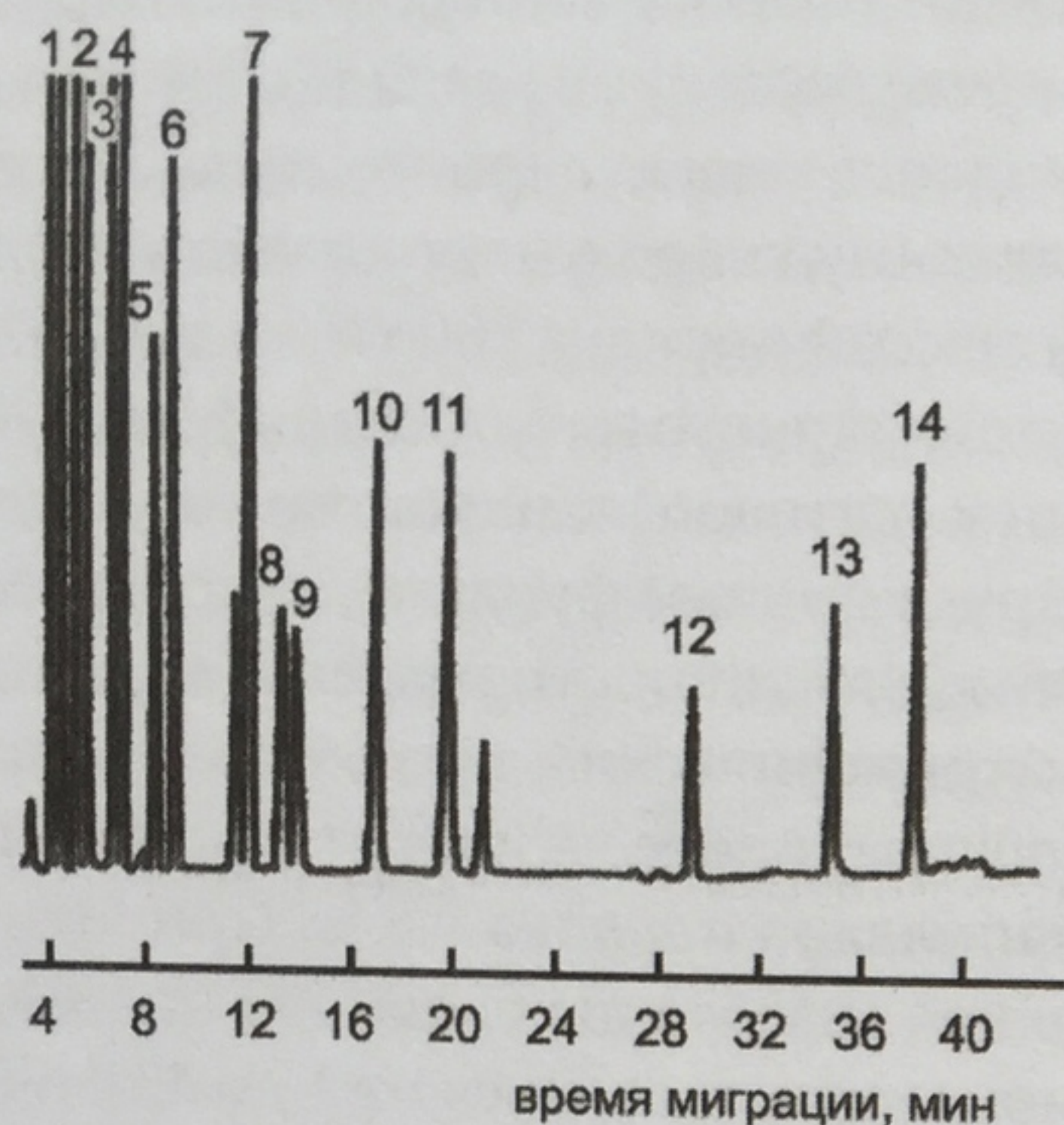


Рис. 10.8. Разделение смеси лекарственных и наркотических веществ методом мицеллярной электрокинетической хроматографии. Капилляр размером 25 см × 50 мкм; напряжение 15 кВ; температура 40°C; переносящий электролит содержит 85 мМ додецилсульфата натрия, 8.5 мМ бората и 15% ацетонитрила, pH 8.5. УФ-детектирование при длине волны 210 нм. Обозначение пиков: 1 – псилоцибин; 2 – морфин; 3 – фенобарбитал; 4 – псилоцин; 5 – кодеин; 6 – метаквалон; 7 – ЛСД; 8 – героин; 9 – амфетамин; 10 – лоразепам; 11 – фентанил; 12 – фенциклидин (РСР); 13 – каннабинол; 14 – Δ9-тетрагидроканнабинол

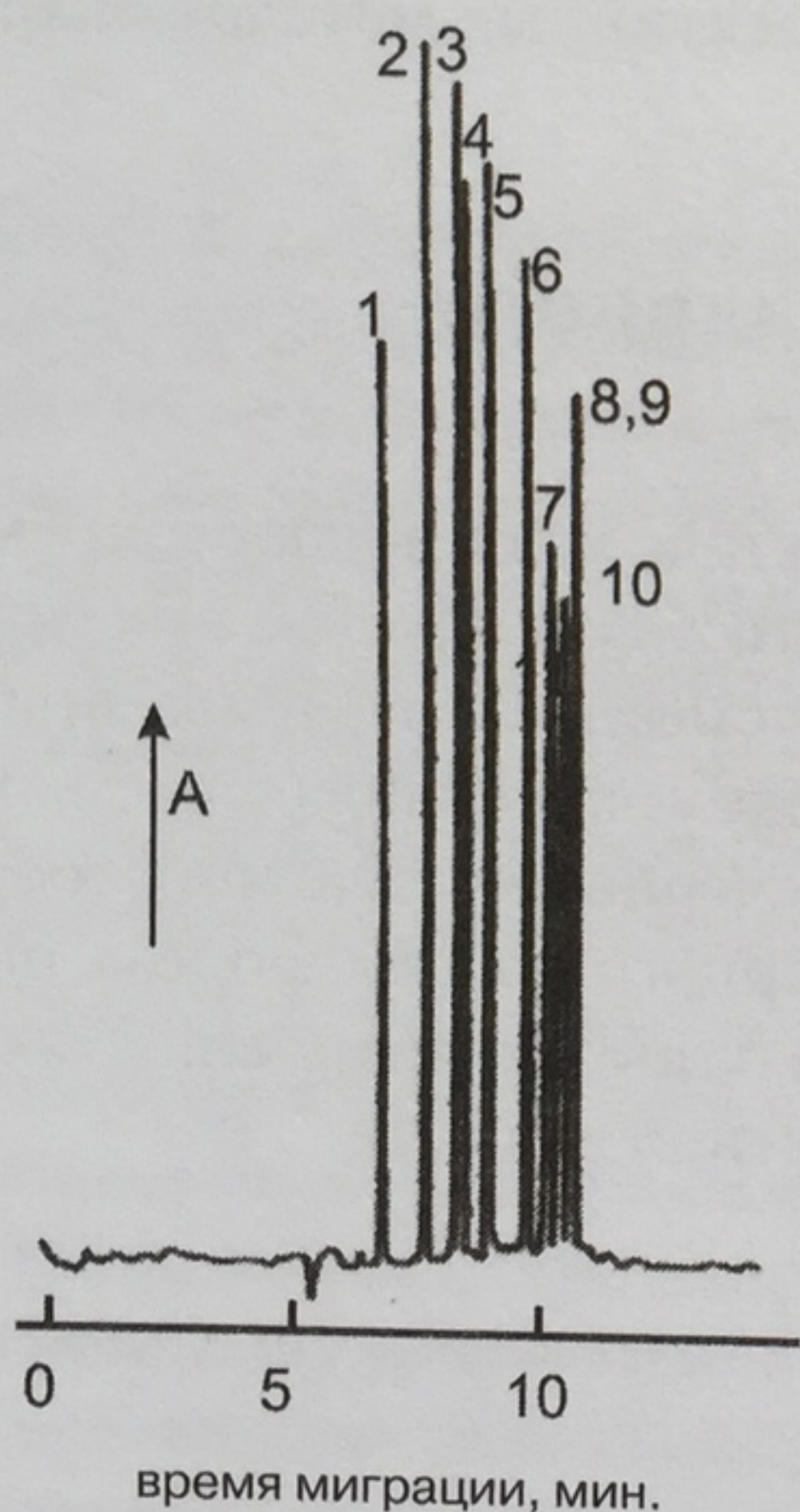


Рис. 10.9. Разделение смеси цефалоспориновых антибиотиков методом мицеллярной электрокинетической хроматографии; 1 – цетилтриметиламмоний; 2 – цефлазидин; 3 – цефотаксим; 4 – цефопираксон; 5 – цефменоксим; 6 – цефпирамид; 7 – цефтриазон; 8 – цефтриаксон; 9 – цефпимизол; 10 – цефминокс. УФ-детектирование при длине волны 210 нм

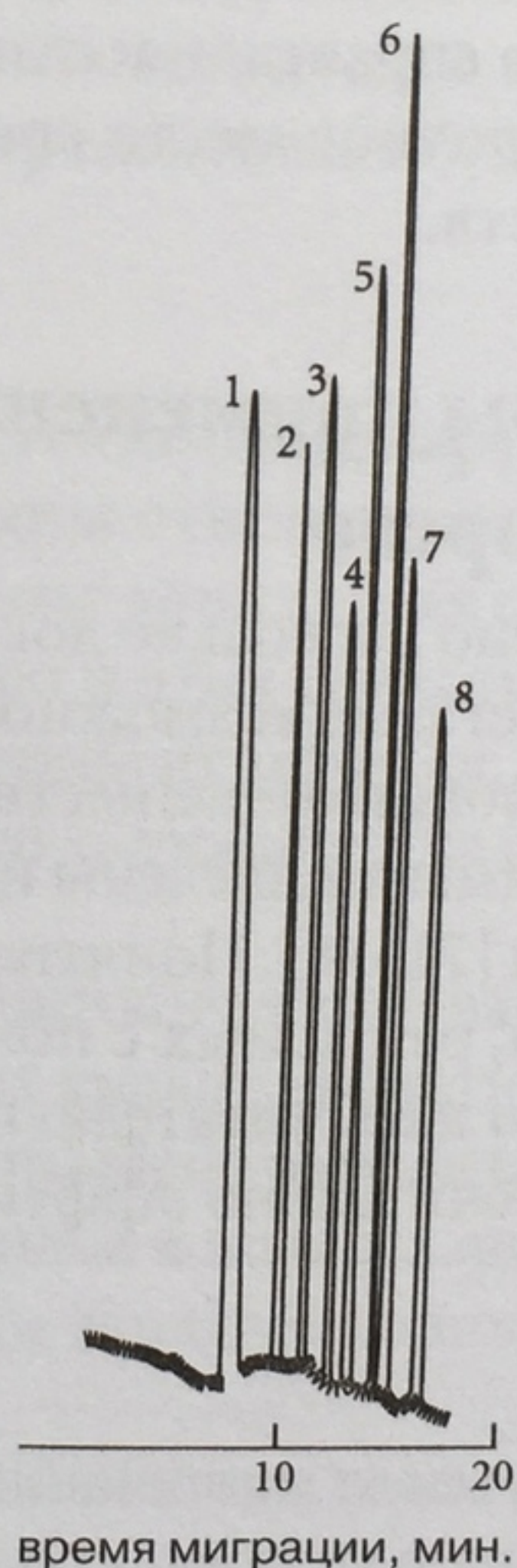


Рис. 10.10. Разделение смеси пуриновых оснований с концентрациями от 2 до 9 мкг/мл методом капиллярного электрофореза. Переносящий электролит – карбонатный буфер с концентрацией 50 мМ (pH 10); напряжение 15 кВ; гидродинамический ввод пробы в течение 20 с. Обозначение пиков: 1 – кофеин; 2 – теобромин; 3 – аденин; 4 – гуанин; 5 – теофиллин; 6 – гипоксантин; 7 – ксантин; 8 – мочевая кислота

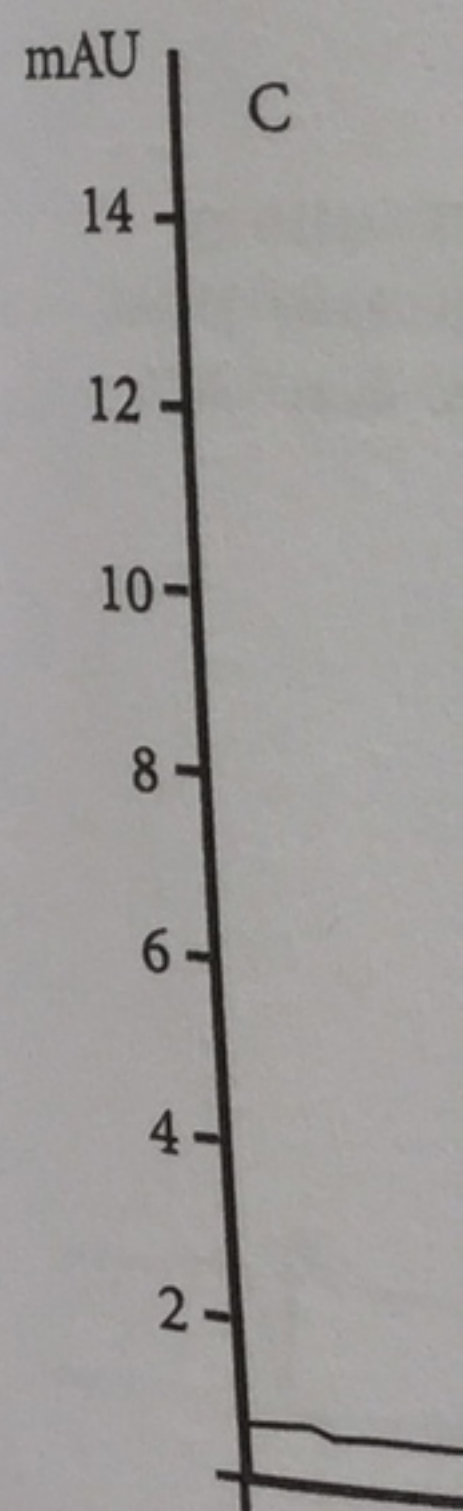


Рис. 10.12. (гемигидрат) кислоты; 3 – фосфата ко 7 – диметил 10 – 4-изоб Прибор НР длиной 48, боратного гидродина

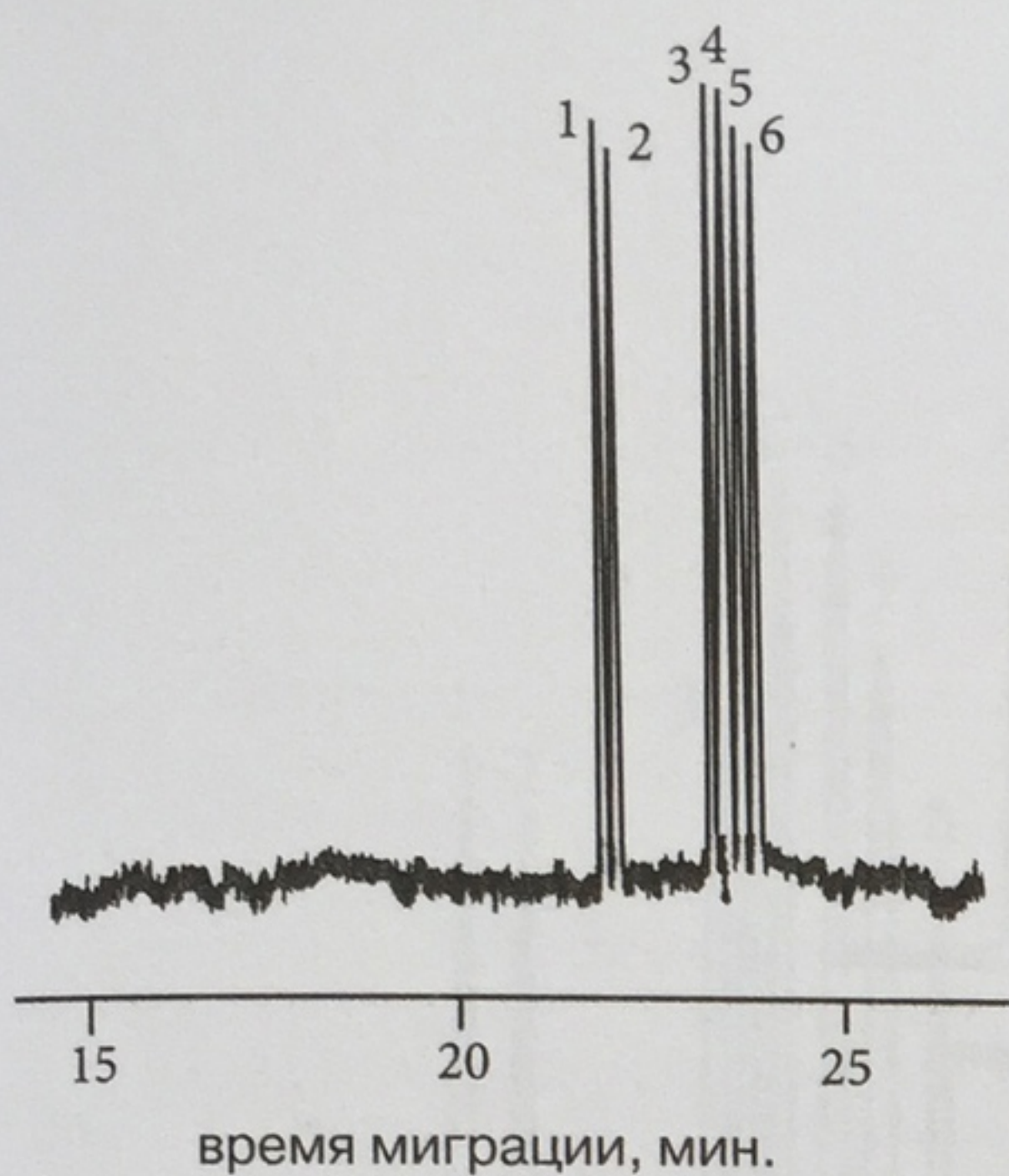


Рис. 10.11. Электроферограмма разделения оптических изомеров блокатора кальциевых каналов верапамила и двух его аналогов – норверапамила и галлопамила. Кварцевый капилляр диаметром 50 мкм, напряжение 20 кВ, ток 8,4 мкА, гидродинамический ввод пробы при 0,015 кг/см² в течение 1 с; переносящий электролит содержал 25% метанола и поверхностно-активные вещества дезоксихолат натрия и полиоксиэтилен-4-додециловый эфир. Общая концентрация поверхностно-активных веществ была 50 мМ. УФ-детектирование при 210 нм. Обозначение пиков: 1 – (-)галлопамил; 2 – (+)галлопамил; 3 – (-)верапамил; 4 – (+)верапамил; 5 – (-)норверапамил; 6 – (+)норверапамил

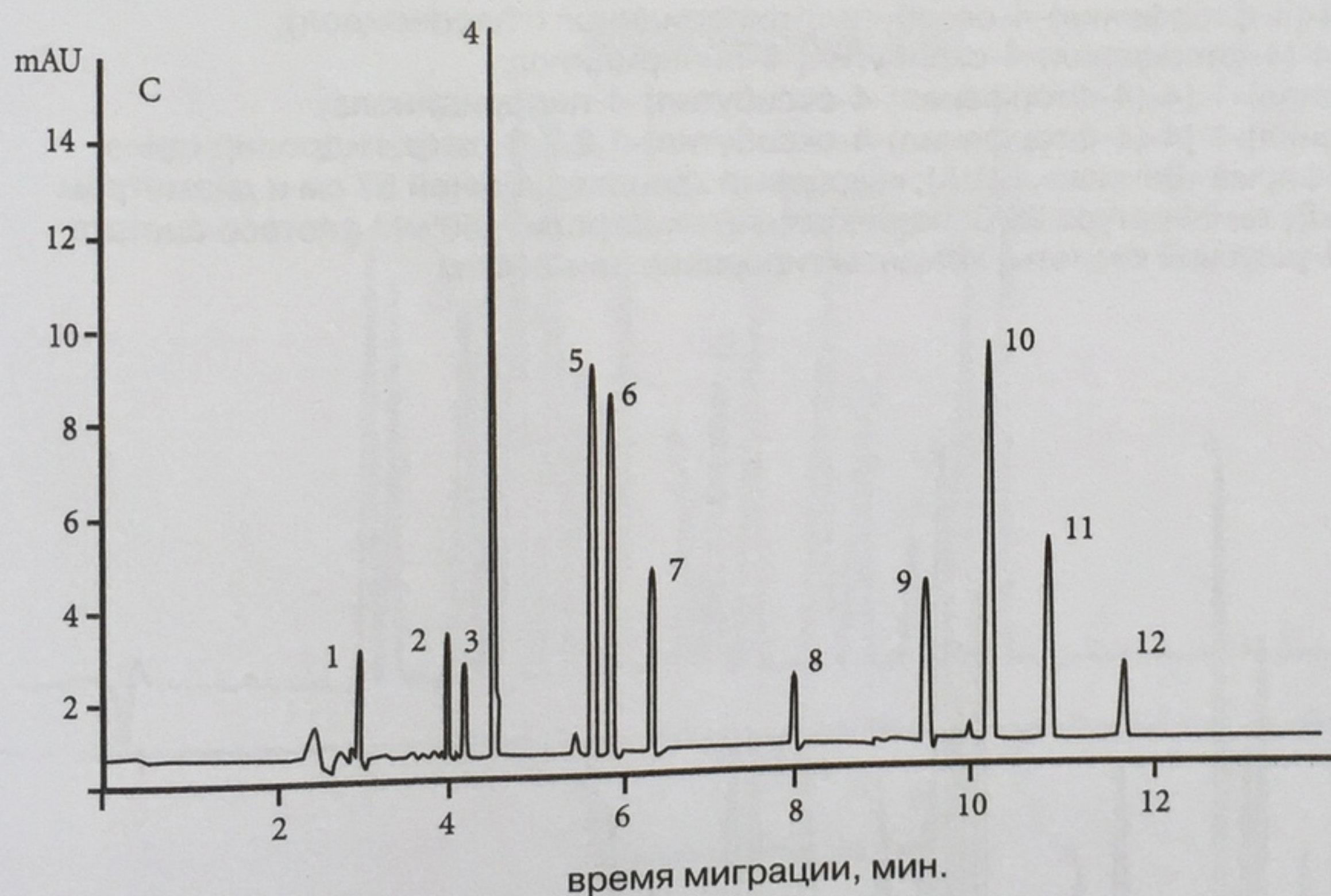


Рис. 10.12. Разделение модельной смеси примесей и продуктов деградации ибупрофена (гемигидрата фосфата кодеина): 1 – N-оксид кодеина; 2 – 2-(4-изобутирилфенил)-пропионовая кислота; 3 – 2-[4-(1-окси-2-метилпропил)-фенил]-пропионовая кислота; 4 – ибупрофен (гемигидрат фосфата кодеина); 5 – бензойная кислота (внутренний стандарт); 6 – кодеин; 7 – диметилпсевдоморфин; 8 – тебаин; 9 – 2-(4-изобутилфенил) пропионамид; 10 – 4-изобутилацетофенон; 11 – метилкодеин; 12 – сложный эфир ибупрофена и кодеина. Прибор HP^{3D}CE, (фирма «Хьюлетт-Паккард»), УФ-детектирование при 214 нм; кварцевый капилляр длиной 48,5 см (рабочая длина 40 см) и диаметром 50 мкм; переносящий электролит – смесь боратного буферного раствора с 9% ацетонитрила, содержащая 40 мМ додецилсульфата натрия; гидродинамический ввод проб 3 с при давлении 0,05 кг/см² (примерно 5 нл)

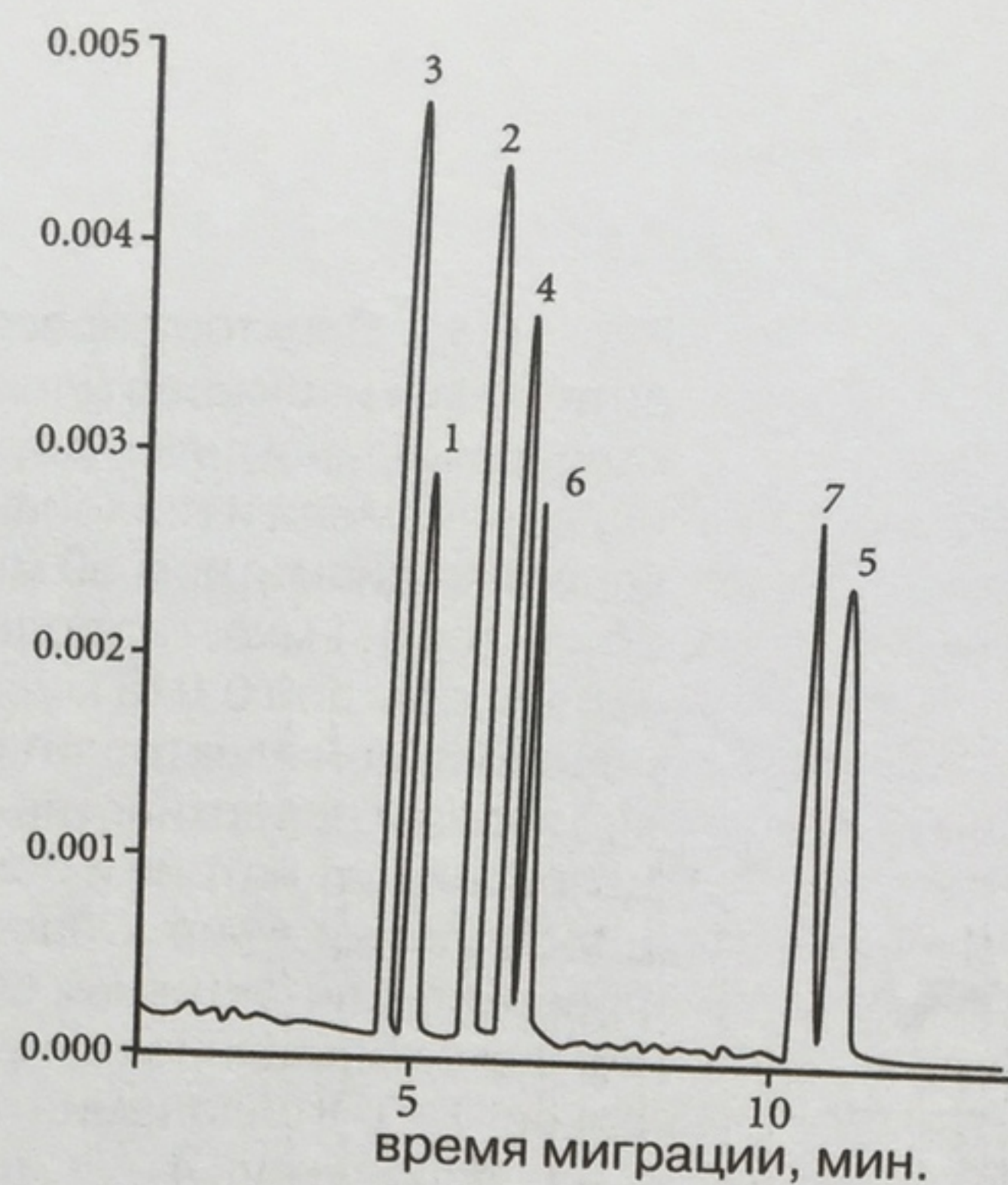


Рис. 10.13. Разделение смеси нейролептических средств – аналогов галоперидола:
 1 – 4-(4-хлорфенил)-1-[4-(4-фторфенил)-4-оксобутил]-1,2,3,6- тетрагидропиридин;
 2 – 4-(4-хлорфенил)-4-оксипиперидин;
 3 – 4-(4-хлорфенил)-1-[4-(4-фторфенил)-4-оксобутил]-пиридиinium
 4 – 4-(4-хлорфенил)-1-[4-(4-фторфенил)-4-оксобутил]-пиперидинол (галоперидол);
 5 – 4-(4-хлорфенил)-1-[4-(4-фторфенил)-4-оксибутил]-4-пиперидинол;
 6 – N-оксид 4-(4-хлорфенил)-1-[4-(4-фторфенил)-4-оксибутил]-4-пиперидинола;
 7 – N-оксид 4-(4-хлорфенил)-1-[4-(4-фторфенил)-4-оксобутил]-1,2,3,6- тетрагидропиридина.
 Прибор Р/АСЕ 2100 СЕ (фирма «Бекман», США); кварцевый капилляр длиной 57 см и диаметром 50 мкм; напряжение 30 кВ; температура 25°C; переносящий электролит – 50 мМ раствор ацетата аммония с добавкой 1 % уксусной кислоты; УФ-детектирование при 214 нм

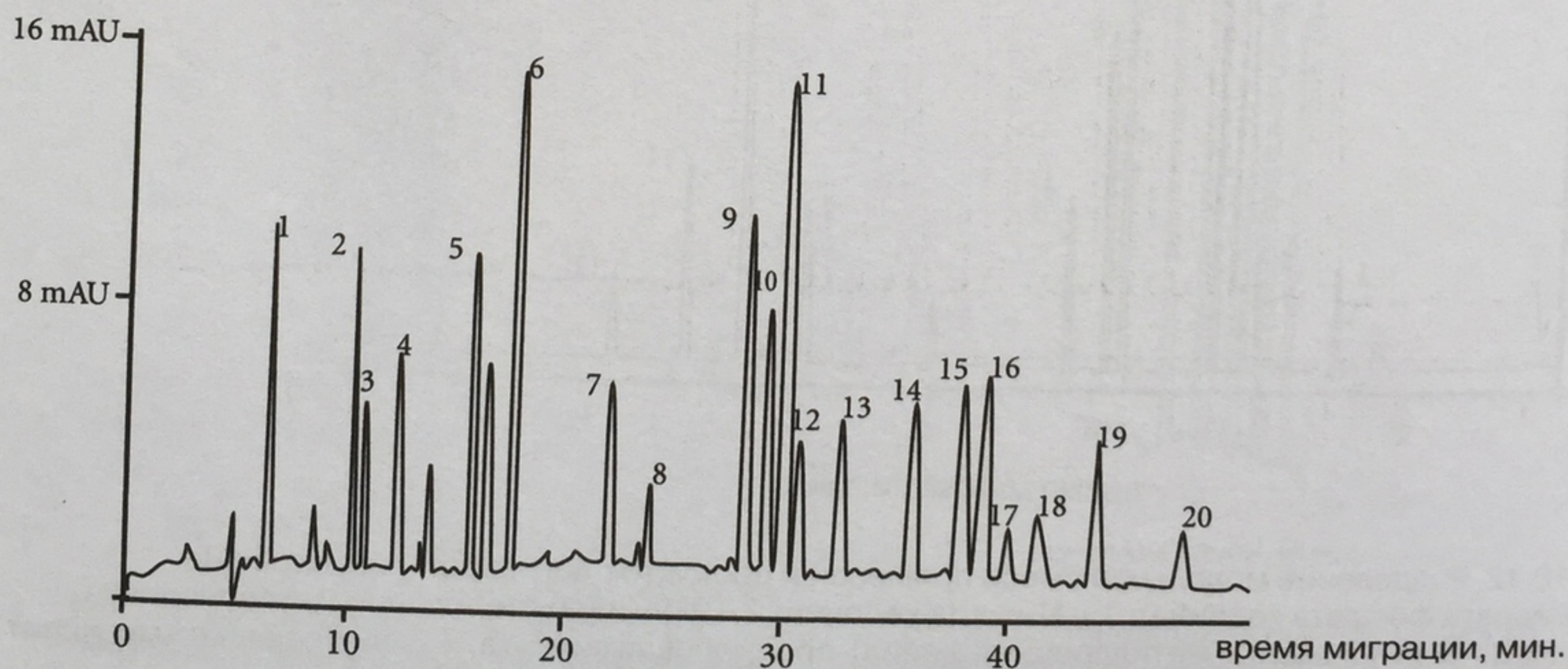


Рис. 10.14. Электроферограммы экстракта растения *Taxus brevifolia*, содержащего вещества, обладающие мощной противораковой активностью: 1 – баккатин III; 2 – цефаломаннин; 3 – таксолдигтерпеновый амид, обладающий высокой противораковой активностью. Расшифровка прочих пиков здесь не приводится. Мицеллярная электрокинетическая хроматография при напряжении 25 кВ на кварцевом капилляре размером 87 см x 50 мкм в потоке подвижной фазы трис-фосфатного буфера с pH 8.5, содержащего 50 мМ додецилсульфата натрия и 25% ацетонитрила

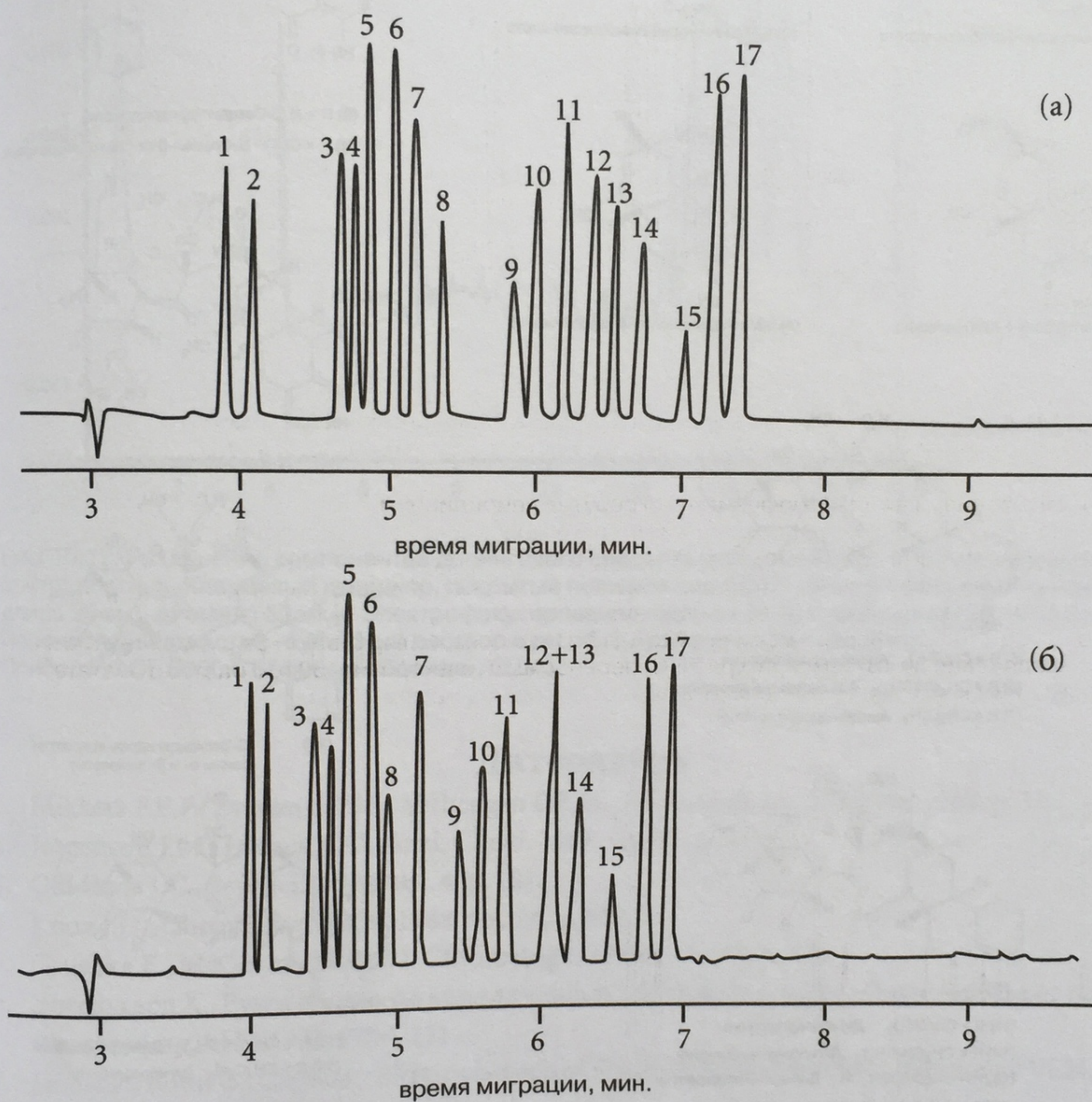


Рис. 10.15. Разделение смеси алкалоидов спорыньи: прибор Р/АСЕ 2100 СЕ (фирма «Бекман», США); кварцевый капилляр длиной 37 см (эффективная длина 30 см) и диаметром 50 мкм; напряжение 13.5 кВ; температура 20°C; переносящий электролит—50 мМ фосфатный буферный раствор (а); тот же раствор с добавкой 40 мМ 1,3-бис(тетрадецил-N,N-диметиламмоний)-2-пропанола (б); УФ-детектирование при 214 нм. Гидродинамический ввод пробы при давлении 0.04 кг/см². Обозначение пиков см в подписи к рис. 10.16

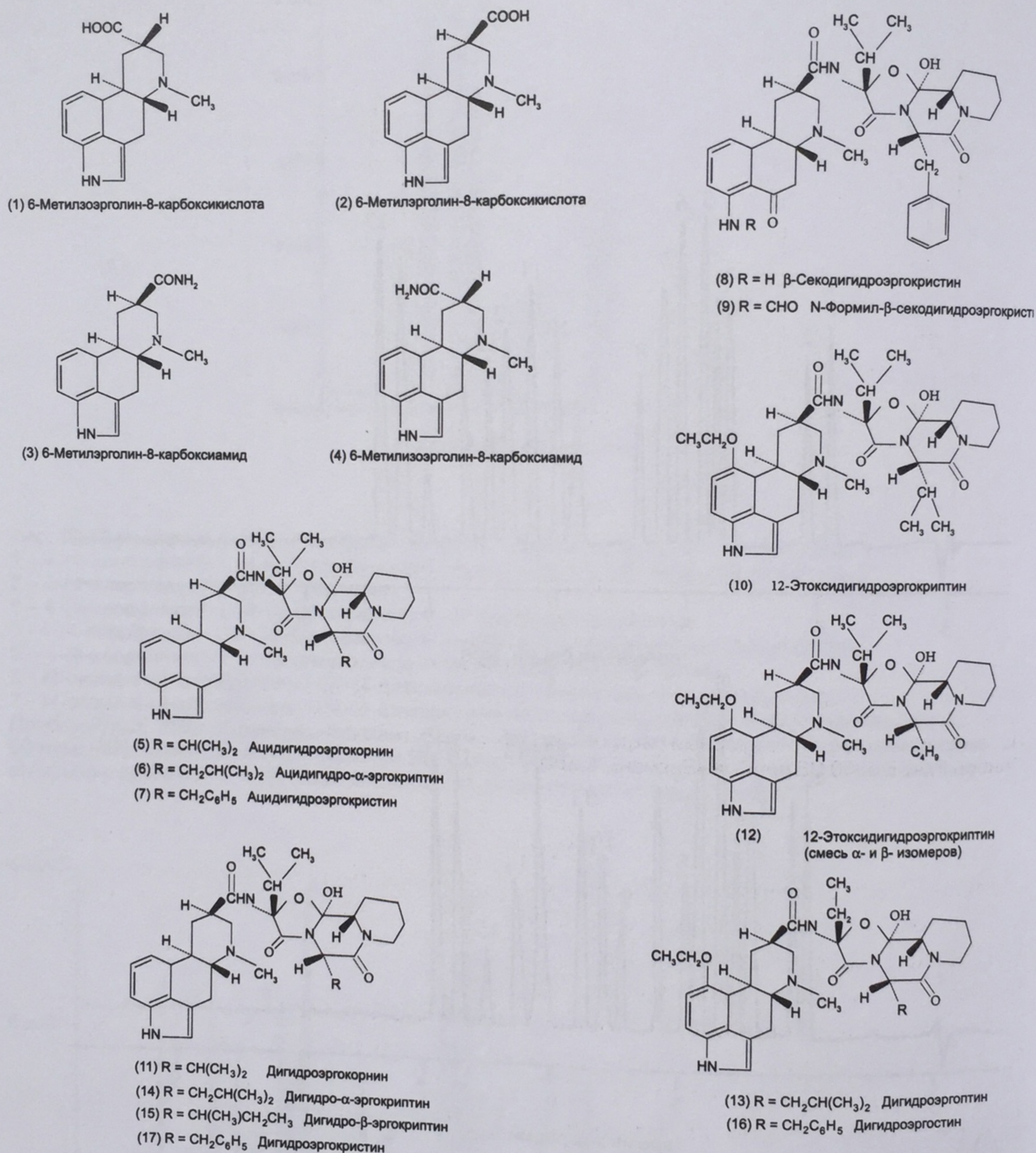


Рис. 10.16. Основные физиологически активные компоненты спорыньи: 1 – 6-метилизоэрголин-8-карбоксикислота; 2 – 6-метилэрголин-8-карбоксикислота; 3 – 6-метилэрголин-8-карбоксиамид; 4 – 6-метилизоэрголин-8-карбоксиамид; 5 – $R = CH(CH_3)_2$ ацидигидроэргокорнин; 6 – $R = CH_2CH(CH_3)_2$ ацидигидро- α -эргокриптин; 7 – $R = CH_2C_6H_5$ ацидигидроэргокристин; 8 – $R = H$ β -секодигидроэргокристин; 9 – $R = CHO$ N-формил- β -секодигидроэргокристин; 10 – 12-этоксидигидроэргокорнин; 11 – $R = CH(CH_3)_2$ дигидроэргокорнин; 12 – 12-этоксидигидроэргокриптин (смесь α - и β -изомеров); 13 – $R = CH_2CH(CH_3)_2$ дигидроэргоптин; 14 – $R = CH_2CH(CH_3)_2$ дигидро- α -эргокриптин; 15 – $R = CH(CH_3)CH_2CH_3$ дигидро- β -эргокриптин; 16 – $R = CH_2C_6H_5$ дигидроэргостин; 17 – $R = CH_2C_6H_5$ дигидроэргокристин

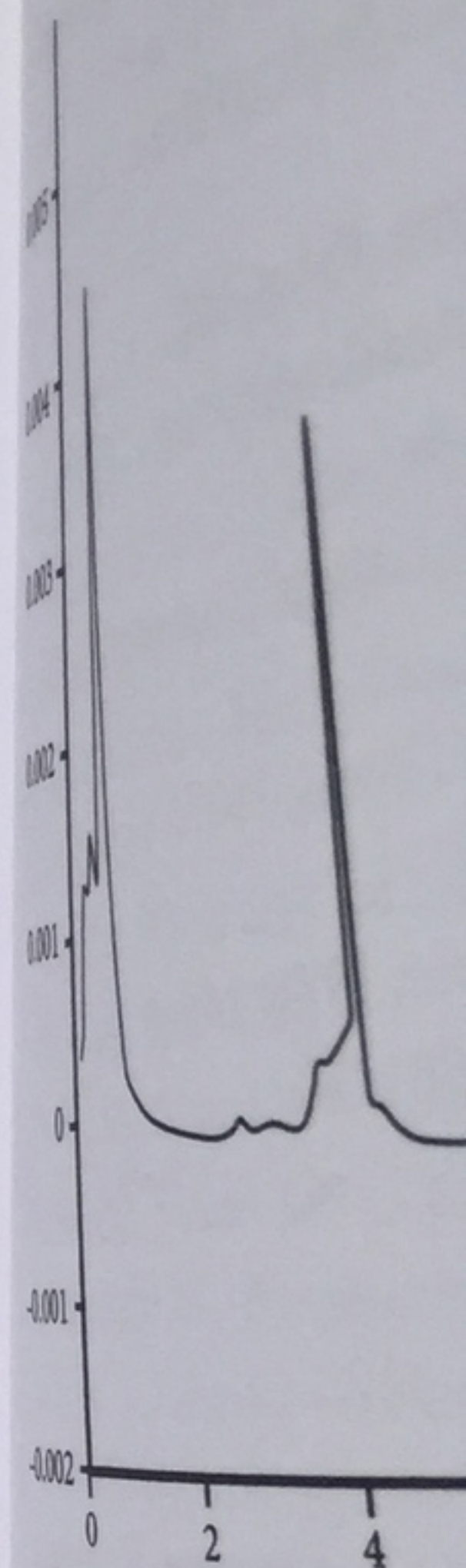


Рис. 10.17. Разделение компонентов эрготамина. Кварцевый столб, длина 20 см, диаметр 50 мкм. Переносчик амфолит-б. Прибор Р/АСЕ 5000 СЕ (Ф)

1. Mikkers F.E.P., Evera
2. Jorgenson J.M., Luk
3. Giddinds J.C., Sep. S
4. Knox J.H., Chroma
5. Grushka E., McC
6. Энгельгард Х., Рун
7. Jandik P., Bonn G.
8. Kuhn R., Hoffstet
9. Foret F. Krivank
10. Heiger D.N., Hig
11. Kuhir W.G., An
12. Engelhardt H.
13. Li S.F.Y., C

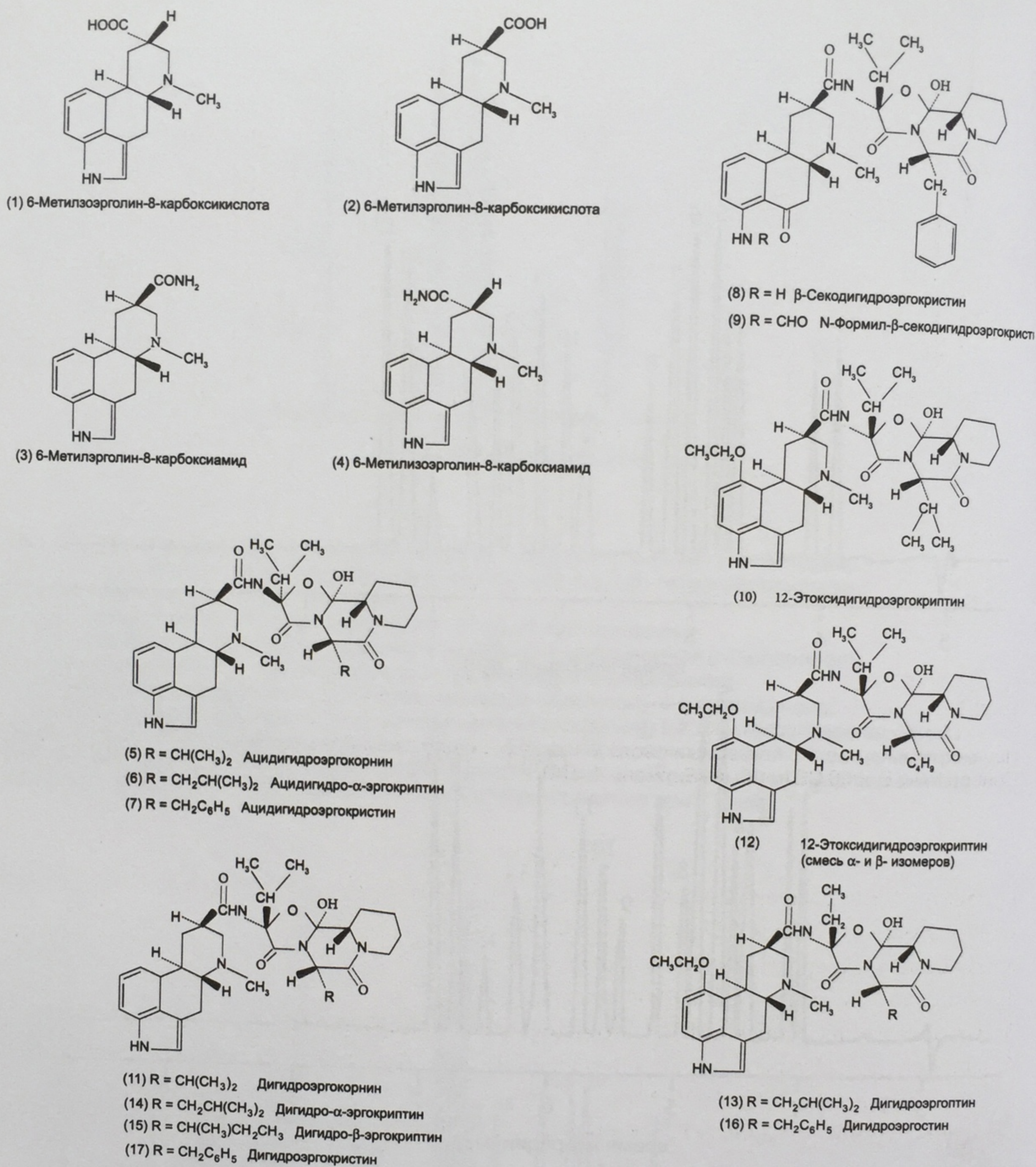


Рис. 10.16. Основные физиологически активные компоненты спорыньи: 1 – 6-метилизоэрголин-8-карбоксикислота; 2 – 6-метилэрголин-8-карбоксикислота; 3 – 6-метилэрголин-8-карбоксиамид; 4 – 6-метилизоэрголин-8-карбоксиамид; 5 – $R = CH(CH_3)_2$ ацидигидроэргокорнин; 6 – $R = CH_2CH(CH_3)_2$ ацидигидро- α -эргокриптин; 7 – $R = CH_2C_6H_5$ ацидигидроэргокристин; 8 – $R = H$ β -секодигидроэргокристин; 9 – $R = CHO$ N-формил- β -секодигидроэргокристин; 10 – 12-этоксидигидроэргокорнин; 11 – $R = CH(CH_3)_2$ дигидроэргокорнин; 12 – 12-этоксидигидроэргокриптин (смесь α - и β -изомеров); 13 – $R = CH_2CH(CH_3)_2$ дигидроэргоптин; 14 – $R = CH_2CH(CH_3)_2$ дигидро- α -эргокриптин; 15 – $R = CH(CH_3)CH_2CH_3$ дигидро- β -эргокриптин; 16 – $R = CH_2C_6H_5$ дигидроэргостин; 17 – $R = CH_2C_6H_5$ дигидроэргокристин

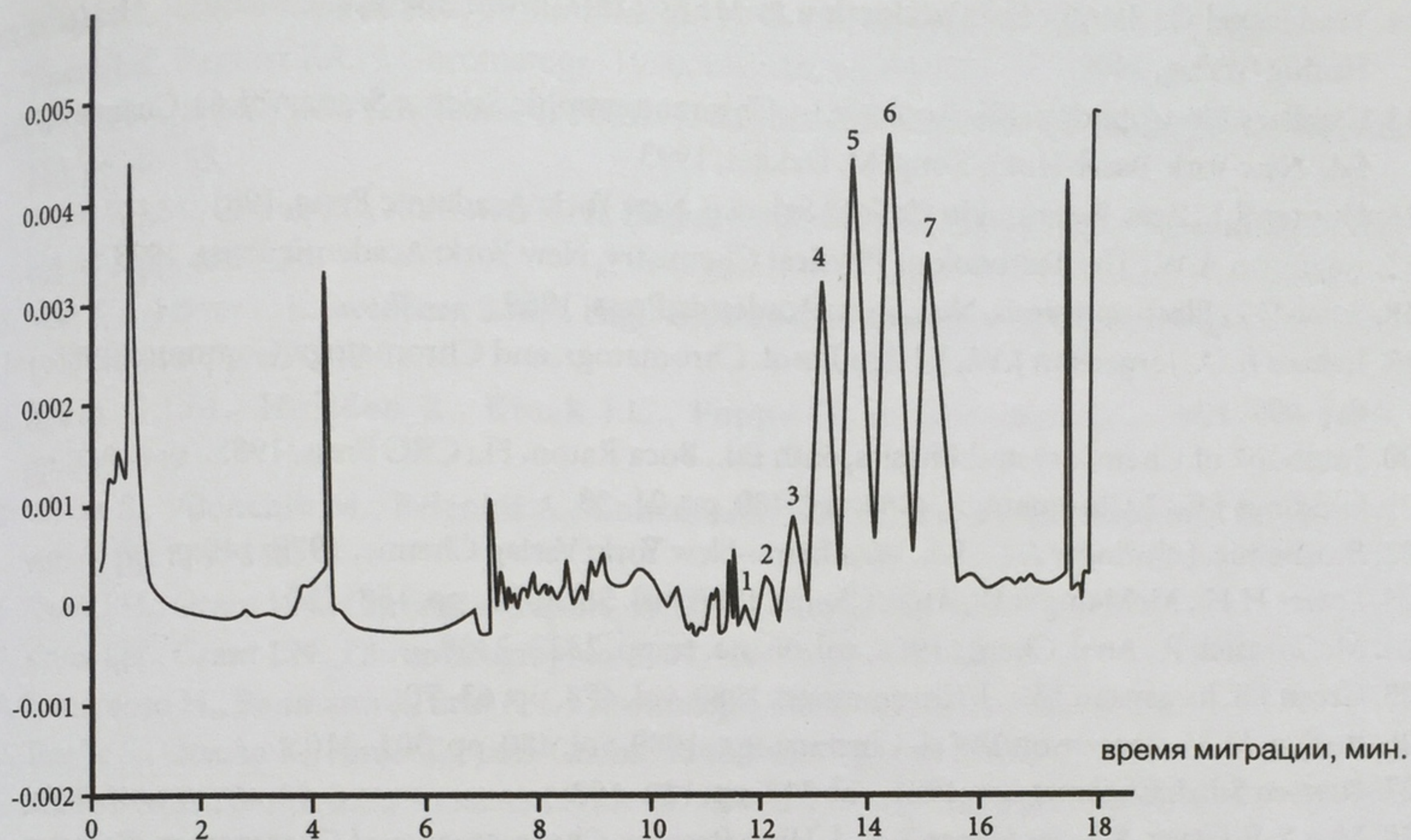


Рис. 10.17. Разделение компонентов допингового средства эритропоэтина: 1 – 7-гликоформы эритропоэтина. Кварцевый капилляр, покрытый полиакриламидом, длина 27 см (эффективная длина 20 см), диаметр 50 мкм. Электрофокусирование проведено при напряжении 25 кВ за 6 мин. Переносный амфолит-буферный раствор с pH = 5.5 с добавкой 7 М мочевины. Прибор P/ACE 5000 CE (фирма «Бекман», США).

Литература

1. Mikkers F.E.P., Everaerts P.M., Verheggen P.E.M., J. Chromatogr., 1979, vol. , 169, p. 11.
2. Jorgenson J.M., Lukacs K.D., Anal. Chem. 1981, vol. 53, p. 1298.
3. Giddinds J.C., Sep. Sci., 1969, vol. 4, p. 181.
4. Knox J.H., Chromatographia, 1988, vol. 26, p. 329.
5. Grushka E., McCormick R.M., J. Chromatogr., 1989, vol. 471, p. 421.
6. Энгельгард Х., Руководство по капиллярному электрофорезу, М.: Научный Совет по хроматографии АН СССР, 1996, 231 с.
7. Jandik P., Bonn G., Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions. Weinheim: VCN, 1993, 303 p.
8. Kuhn R., Hoffsteter-Kuhn S., Capillary Electrophoresis: Principles and Practice, New York, Berlin: Springer-Verlag, 1993, 375 p.
9. Foret F. Křivánková L., Boček P., Capillary Zone Electrophoresis, New York: VCH, 1993, 346 p.
10. Heiger D.N., High Performance Capillary Electrophoresis, Waldbronn: Hewlett-Packard GmbH, 1992, 280 p.
11. Kuhir W.G., Anal. Chem., 1990, vol. 63, pp. 403R–414R; 1992, vol. 64, pp. 389R–407R.
12. Engelhardt H., Berk W., Kohr J., Schmitt T., Angew. Chem., 1993, vol. 105, pp. 659–680.
13. Li S.F.Y., Capillary Electrophoresis; In: J. Chromatogr. Libr., vol. 52, Amsterdam: Elsevier, 1992.

14. Vindevogel G., Sandra P., Introduction to MEKC; In: *Chromatographic Methods*, Heidelberg: Huthig-Verlag, 1992.
15. Capillary Electrophoresis Technology; In: *Chromatographic Science Series*, Vol. 64, Guzman N.A., Ed., New York-Basel-Hong Kong: M. Dekker, 1993.
16. Hunter R.J., *Zeta-Potential in Colloid Science*, New York: Academic Press, 1981.
17. Adamson A.W., *The Textbook of Physical Chemistry*, New York: Academic Press, 1973.
18. Snaw D.J., *Electrophoresis*, New York: Academic Press, 1969.
19. Lukacs K.D., Jorgenson J.W., *J. High Resol. Chromatogr. and Chromatogr. Commun.*, 1985, vol. 8, p. 407.
20. *Handbook of Chemistry and Physics*, 66th Ed., Boca Raton, Fl.: CRC Press, 1985.
21. Giddings J.C., *J. Chromatogr.*, 1989, vol. 480, pp. 21-33.
22. *Biochemie*, Lehninger A.L., Ed., Weinheim-New York: Verlag Chemie, 1979, 140 p.
23. Lower H.H., McManigill D., *Anal. Chem.*, 1986, vol. 58, no. 1., pp. 166-170.
24. McCormick R., *Anal. Chem.*, 1988, vol. 60, no. 6., pp. 2322-2338.
25. Green J.S., Jorgenson J.W., *J. Chromatogr.*, 1989, vol. 478, pp. 63-70.
26. Bushey M.M., Jorgenson J.W., *J. Chromatogr.*, 1989, vol. 480, pp. 301-310.
27. Hjerten S.J., *J. Chromatogr.*, 1985, vol. 347, pp. 189-198.
28. Maa Y. F., Hyver. K.J., Swedberg S.A., *J. High Resolut. Chromatogr. and Chromatogr. Commun.*, 1991, vol. 14, no. 1, pp. 65-67.
29. Hjerten S.J., *Electrophoresis*, 1990, vol. 11, pp. 665-690.
30. Mikkers F.E.P., Everaerts F.M., Verheggen Th.P.E.M., *J. Chromatogr.*, 1979, vol. 169, no. 1., pp. 1-10.
31. Mosher R.A., Saville D.A., Thormann W., *The Dynamics of Electrophoresis*; In: *Electrophoresis Library*, Weinheim: Verlag Chemie., 1982.
32. Kleparniak K., Bocek P., *J. Chromatogr.*, 1991, vol. 480, pp. 3-42.
33. Huang X., Coleman W.F., Zare R.J., *J. Chromatogr.*, 1989, vol. 489, pp. 95-110.
34. Vinther A., Sørensen H.J., *J. Chromatogr.*, 1991, vol. 559, pp. 3-26.
35. Moring S.E., Colburn J.C., Grossman P.D., Lauer H.H., *LC-GC Int.*, 1990, vol. 3, pp. 46-52.
36. Chien R. L., Burgi D.S., *Anal. Chem.* 1992, vol. 64, pp. 489A-96A.
37. Burgi D.S., Chien R. L., *Anal. Chem.* 1991, vol. 63, pp. 2042-2047.
38. Chien R. L., Burgi D.S., *Anal. Chem.* 1992, vol. 64, pp. 1046-1050.
39. Burgi D.S., Chien R. L., *Anal. Biochem.*, 1992, vol. 202, pp. 306-309.
40. Chien R. L., Burgi D.S., *J. Chromatogr.*, 1991, vol. 559, pp. 141-152.
41. Jandik P., Jones W.R., *J. Chromatogr.*, 1991, vol. 546, pp. 431-443.
42. Kurosu Y., Inc., Hibi K., Sasaki T., Saito M., *J. High Resolut. Chromatogr. and Chromatogr. Commun.*, 1991, vol. 14, pp. 200-203.
43. Supelco Biotext, 1991, no. 4, pp. 12-14.
44. Tsuda T., Siweedler J.V., Zare R.N., *Anal. Chem.*, 1990, vol. 62, pp. 2149-2152.
45. Hjerten S., *J. Chromatogr.*, 1985, vol. 347, pp. 198-198.
46. Novotny M.V., Cobb K.A., Liu J., *Electrophoresis*, 1990, vol. 11, pp. 715-749.
47. Cobb K.A., Dolnik V., Novotny M. V., *Anal. Chem.*, 1990, vol. 62, pp. 2478-2483.
48. Towns J.K., Regnier F.R., *Anal. Chem.*, 1991, vol. 63, pp. 1126-1132.

49. Towns J.K., Bao J., Regnier F.R., *J. Chromatogr.*, 1992, vol. 599, pp. 227-237.
50. Towns J.K., Regnier F.R., *J. Chromatogr.*, 1990, vol. 516, pp. 69-78.
51. Herren B.J., Shafer S.G., Van Alstine J., Harris J.M., Snyder R.S., *J. Colloid Interface Sci.*, 1987, vol. 115, pp. 46-55.
52. Bruin G.J.M., Chang J.P., Kuhlman R.H., Zegers K., Kraak J.C., Poppe H., *J. Chromatogr.*, 1989, vol. 471, pp. 429-436.
53. Maa Y. F., Hyver K.J., Swedberg S.A., *J. High Resolut. Chromatogr. and Chromatogr. Commun.*, 1991, vol. 14, pp. 65-67.
54. Bruin G.J.M., Huisden R., Kraak J.C., Poppe H., *J. Chromatogr.*, 1989, vol. 480, pp. 339-349.
55. Wicar S., Vilenchik M., Belenkii A., Cohen A.S., Karger B.L., *J. Microcolumn Sep.*, 1992, vol. 4, pp. 339-348.
56. Knox J.H., Grant I.N., *Chromatographia*, 1987, vol. 24, pp. 135-143.
57. Knox J.H., Grant I.N., *Chromatographia*, 1991, vol. 32, pp. 317-328.
58. Yamamoto H., Baumann J., Erni F., *J. Chromatogr.*, 1992, vol. 593, pp. 313-319.
59. Terabe S., Otsuka K., Ando T., *Anal. Chem.*, 1985, vol. 57, pp. 834-841.
60. Khaledi M.G., Smith S.C., Strasters J.K., *Anal. Chem.*, 1991, vol. 63, pp. 1820-1830.
61. Foley J.P., *Anal. Chem.*, 1990, vol. 62, pp. 1302-1308.
62. Swedberg S.A., *J. Chromatogr.*, 1990, vol. 503, pp. 449-452.
63. Cole R.O., Sepaniak M.J., *LC-GC*, 1991, vol. 10, pp. 380-385.
64. Grossman P.D., Soane D.S., *J. Chromatogr.*, 1991, vol. 559, pp. 257-266.
65. Noolandi J., in *Advances in Electrophoresis*, vol. 5, Chrambach A., Dunn M.J., Radola B. J., Eds., Weinheim: Verlag Chemie, 1982.
66. Righetti P.G., Caglio S., Saracchi M., Quaroni S., *Electrophoresis*, 1992, vol. 13, pp. 587-595.
67. Zhu M., Hansen D.L., Burd S., Gannon F., *J. Chromatogr.*, 1989, vol. 480, pp. 311-319.
68. Ganzler K., Greve K.S., Cohen A.S., Karger B.L., *Anal. Chem.*, 1992, vol. 64, pp. 2665-2671.
69. Yin H. F., Lux J.A., Schomburg G., *J. High Resolut. Chromatogr. and Chromatogr. Commun.*, 1990, vol. 13, pp. 624-627.
70. Foret F., Demi M., Boček P., *Electrophoresis*, 1986, vol. 7, p. 451.
71. Weinberger R., Lurie I.S., *Anal. Chem.*, 1991, vol. 63, p. 823.
72. Nishi H., Tsumaragi N., Kakimoto T., Terabe S., *J. Chromatogr.*, 1989, vol. 477, pp. 259-270.
73. Persons-Stubberud K., Åsteröm O., *J. Chromatogr. A*, 1998, vol. 798, pp. 95-102.
74. Hyötyläinen T., Siren H., Riekkola M. L., *J. Chromatogr. A*, 1996, vol. 738, pp. 438-447.
75. Naylor S., Benson L., Tomlison A.J.M., *J. Chromatogr. A*, 1996, vol. 735, pp. 213-223.
76. Tagliaro F., Smith P.P., Tarerina S., Equisetto V., Marigo M., *J. Chromatogr. A*, 1996, vol. 735, pp. 227-235.
77. Chen K., Locke D.C., Maldaker T., Lin J. J., Aawasiripong S., Shurrath U., *J. Chromatogr. A*, 1998, vol. 822, pp. 281-290.
78. Cifuentes A., Moreno-Arribas M.V., le Frutos M., Diez-Masa J.C., *J. Chromatogr. A*, 1999, vol. 830, pp. 453-463.

ГЛАВА 11

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОТОПНОГО СОСТАВА НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

В последние годы приобретает большое значение определение изотопного состава наркотических средств. Информация о соотношении содержания изотопов легких элементов (углерода, азота, кислорода и водорода), входящих в состав исследуемого наркотического средства, позволяет получить ряд ценных сведений о регионе произрастания продуцирующих данный наркотик растений, об источнике производства синтетических наркотических средств и в ряде случаев получить прямые указания об источнике поступления наркотического средства на рынок.

Особое значение в этой связи имеет проблема установления географического происхождения наркотических веществ, в частности, получаемых из природных источников – эта проблема до сих пор остается актуальной во всем мире. Один из путей ее решения основан на измерении изотопных отношений углерода и азота в исследуемых веществах, обладающих наркотическим действием. Такие соотношения для наркотических веществ и сопровождающих примесей стало возможно определять с помощью весьма совершенных приборов, использующих принцип хромато-масс-спектрометрии. Таким прибором, например, является изотопный масс-спектрометр DELTA Plus (фирма «Финиган МАТ», США), соединенный с газовым хроматографом и элементным анализатором. Разделенные в газовом хроматографе компоненты подвергаются сжиганию в токе кислорода в присутствии катализаторов, и масс-спектрометр определяет соотношение количеств образовавшегося углекислого газа с молекулярной массой 44 (для изотопа углерода ^{12}C) и 45 (для изотопа углерода ^{13}C).

Полученные результаты по изотопному составу обычно выражают в форме изотопных соотношений наркотических веществ $\delta^{13}\text{C}$ для углерода и $\delta^{15}\text{N}$ для азота, выражающих отклонение найденных изотопных соотношений от соответствующих величин для стандартов. Под изотопным составом понимают относительную распространенность изотопов данного элемента, выраженную обычно в виде отношения малораспространенного изотопа к более распространенному изотопу: $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ и т.п. В современной научной литературе изотопный состав принято представлять в виде величины δ , представляющей собой отклонение (обычно в тысячных долях, ‰) от условного стандарта. Например, для углерода величина δ равна:

$$\delta^{13}\text{C} = 1000 \times [(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{обр}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{станд}}] / (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{станд}}, \quad (11.1)$$

где общепринятым стандартом является PDB, представляющий собой кальцит окаменелости *Belemnitella americana* (белеминит) мелового возраста, для которого $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{PDB}} = 0,0112372$. Для азота стандартом является атмосферный азот, имеющий $^{15}\text{N}/^{14}\text{N} = 0,0036765$.

Изотопная масс-спектрометрия широко используется для обнаружения источников загрязнения окружающей среды, для выявления путей миграции животных, для контроля качества продуктов питания и алкоголя [1–4].

Известно, что изотопный состав растений формируется в биохимических процессах, поэтому наблюдаемые изотопные вариации отражают не только видовые различия, но и различия в метаболизме растений, связанные с условиями окружающей среды. Изотопный состав атмосферы окружающей среды, а также такие параметры, как влажность, температура, длительность светового дня, определяют изотопные соотношения элементов в растениях. Растения, произрастающие при высокой влажности или на почве с большим содержанием воды, могут иметь значения изотопных отношений $\delta^{13}\text{C}$ на 4–5‰ более отрицательные, чем растения, растущие в сухом климате. Изотопный состав азота в растениях может изменяться в зависимости от состава почвы и микробной активности азотфиксаторов на 10‰ и более [5]. Процессы биологического фракционирования изотопов подробно рассмотрены в книге [6].

Уже много лет не падает интерес к проблеме установления географического происхождения наркотических веществ, полученных из природных источников сырья [6–12]. В основном, это касается изотопного анализа углерода и азота в героине, морфине и кокаине. Героин (диацетилморфин) является полусинтетическим продуктом, получаемым путем ацетилирования морфина. Так как изотопный состав углерода в используемом при этом уксусном ангидриде может изменяться в зависимости от условий его изготовления, обогащение героина углеродом ^{13}C может быть связано как с географическим происхождением образца, так и с источником уксусного ангидрида, применяемого производителями наркотиков. Информация о изотопном составе углерода уксусного ангидрида имеет большое значение при определении принадлежности образцов к одной партии. А степень обогащения морфина углеродом ^{13}C может указывать на географическое происхождение образцов. Разность между изотопным составом углерода героина и соответствующего деацетилированного героина (морфина) может составлять от –4,99‰ до 0,17‰ [7].

Кокаин является одним из наиболее распространенных наркотических веществ наряду с героином. Определение изотопного состава углерода и азота в образцах кокаина и листьев коки из Боливии, Перу и Колумбии было выполнено авторами статьи [9]. В листьях коки величина $\delta^{13}\text{C}$ изменялась в интервале значений от –32,4‰ до –25,3‰. В то же время величина $\delta^{15}\text{N}$ изменялась в более широком интервале от 0,1‰ до 13‰. Следует также отметить, что для наркотических веществ величины $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ имели на 3–8‰ более отрицательные значения, чем для растений, из которых они были получены [6].

Наиболее полный и серьезный анализ изотопного состава углерода и азота героина и морфина из Южной Америки, Юго-Восточной Азии, Юго-Западной Азии и Мексики, а также кокаина из Южной Америки был выполнен в работе [7]. Оказалось, что героин из четырех названных регионов имел максимальную разницу в изотопном составе углерода 2,4‰ и азота 3,1‰, а морфин – 1,4‰ и 3,5‰, соответственно. Для кокаина максимальная разница в изотопном составе углерода и азота составляла 0,6‰ и 7,1‰, соответственно.

Часто анализируемые наркотические вещества имеют недостоверный источник происхождения, так как образцы отбирают из конфискованных партий наркотиков. Очевидно, что создание и расширение банка данных об изотопном составе имеет ключевое значение для достоверной идентификации географического происхождения источника наркотических веществ. Некоторые данные об изотопном составе углерода и азота наркотических веществ из различных географических регионов приведены ниже

Результаты изотопного анализа углерода и азота листьев конопли, проведенного в работе [13], представлены в таблице 11.1.

Таблица 11.1. Изотопный анализ азота и углерода образцов листьев конопли (S – стандартное отклонение, n – число измерений)

№	Регион	Сорт	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}, \text{‰}$	S, ‰	n	$\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}, \text{‰}$	S, ‰	n
1	Брянская область	Гауховский зеленец	-27,72	0,21	4	1,83	0,27	4
2	Мордовская Республика	ЮСО-27 зеленец	-26,54	0,16	5	-3,17	1,60	5
3	Курская область	Кавказский зеленец	-27,19	0,25	4	1,93	0,30	5
4	Татарская Республика	Кавказский зеленец	-26,50	0,21	5	2,04	0,23	5
5	Сумская область	ЮСО-19 зеленец	-27,65	0,23	5	5,70	0,14	5
6	Приморский край		-26,43	0,16	5	5,17	0,14	4
7	Ставрополье		-28,38	0,12	4	9,65	0,25	4
8	Кабардино-Балкария		-28,12	0,14	4	4,13	0,34	3

Как видно из таблицы, изотопные отношения углерода изменяются в узком интервале от -28,38‰ до -26,43‰, а изотопные отношения азота изменяются в более широком диапазоне от -3,17‰ до 9,65‰. Стандартные отклонения результатов измерения составляют 0,12–0,25‰ для углерода и 0,14–0,37‰ для азота. Листья конопли из Мордовской Республики оказались более неоднородными по структуре, чем другие образцы, что привело к большому разбросу результатов измерений. Данные по изотопному составу углерода и азота листьев конопли, выращенной в различных регионах России и на Украине, получены впервые в работе [13].

Изменения изотопного состава, вероятно, связаны с региональным изменением свойств почв и природно-климатическими условиями произрастания растений. Так, изотопное отношение азота листьев конопли из Ставрополья имеет наибольшее значение $\delta^{15}\text{N}_{\text{air}} = 9,65\text{‰}$, а из Мордовской Республики наименьшее $\delta^{15}\text{N}_{\text{air}} = -3,17\text{‰}$, для изотопных отношений углерода зависимость противоположная $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -28,38\text{‰}$ и $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -26,54\text{‰}$, соответственно.

Таблица 11.2. Изотопные соотношения азота и углерода героина, морфина и соединений, присутствующих в образце

№	Название наркотического вещества	Метод анализа	Героин		Моноацетилморфин	Ацетилкодеин
			$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}, \text{‰}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}, \text{‰}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}, \text{‰}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}, \text{‰}$
1	Героин (Колумбия)	GC-C-MS	-34,95	0,78	-32,73	-34,53
2	Героин (Колумбия)	GC-C-MS	-32,74	0,92	-32,96	-34,64
3	Героин (Колумбия)	GC-C-MS	-35,94	1,08	-34,17	-36,25
4	Героин (Колумбия)	EA-MS	-34,61	1,29		
5	Героин (Колумбия)	EA-MS	-33,26	-6,69		
6	Морфин (Колумбия)	GC-C-MS	-33,38	0,42		
7	Героин (Корея)	GC-C-MS	-35,74	-2,93	-33,99	-36,15
8	Героин (Корея)	GC-C-MS	-38,25	7,15		
9	Героин (Корея)	EA-MS	-35,11	-1,95		
10	Героин (Афганистан)	GC-C-MS	-35,35		-32,21	-34,33

В таблице 11.2 приведены изотопные отношения углерода и азота героина, морфина и некоторых других соединений, присутствующих в этих образцах. С помощью хромато-масс-спектрометра HP 5973 в составе героина были обнаружены ацетилкодеин и моноацетилморфин, в кокаине – кодеин и лидокаин. Ряд примесей идентифицировать не удалось.

Изотопные отношения углерода героина изменяются в интервале значений от -38,25‰ до -32,74‰, а изотопные отношения азота – в более широком диапазоне от -6,69‰ до 7,15‰. Как правило, изотопный состав углерода моноацетилморфина по сравнению с изотопным составом углерода героина обогащен тяжелым изотопом ^{13}C , а изотопный состав углерода ацетилкодеина – легким изотопом. Абсолютное стандартное отклонение результатов определения изотопных отношений углерода составляло 0,09–0,25‰, азота несколько больше – 0,17–0,21‰. В то же время при измерении микропримесей стандартное отклонение достигало 0,45‰.

Как видно из таблицы 11.2, героин из Кореи имеет значения $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ более отрицательные (-38,25÷-35,11‰), чем героин из Колумбии (-35,94÷-32,74‰), а значения $\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}$ более положительные (-1,95÷7,15‰) и (-6,69÷1,29‰), соответственно. При сравнении полученных изотопных соотношений углерода героина с литературными данными [10] можно сделать вывод, что по изотопным отношениям углерода героин из Колумбии, Кореи и Афганистана (таблица 11.2) отличается от героина, произведенного в Нигерии, Таиланде, Пакистане и Индии, но неразличим с героином из Турции.

Наличие характерных примесей в наркотических веществах позволяет повысить достоверность идентификации их происхождения. Например, для героина из Афганистана (номер 10 в табл. 11.2) и из Колумбии (номер 3) разность значений $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ для героина составляет 0,59‰ и увеличивается для моноацетилморфина до 1,96‰, а для ацетилкодеина – до 1,92‰. Для более серьезных выводов необходимо, чтобы база данных по изотопному составу углерода и азота была расширена. Кроме того, изотопный состав углерода героина зависит от изотопного состава углерода уксусного ангидрида, используемого при его производстве. Следует проводить деацетилирование героина, что может позволить более точно определять географическое место его производства.

При измерении изотопных отношений азота наркотических веществ методом хромато-масс-спектрометрии требуется большой объем пробы. Это приводит к перегрузке капиллярной колонки и искажению аналитического пика. При этом возможно также неполное сгорание разделенных компонентов в окислительном реакторе. Влияние этих факторов на правильность измерения изотопного состава в литературе не изучено. Результаты проведения параллельных измерений образцов кокаина с использованием элементного анализатора и хромато-масс-спектрометра приведены в таблице 11.3.

Таблица 11.3. Результаты определения изотопных отношений углерода и азота образцов кокаина с помощью элементного анализатора и методом хромато-масс-спектрометрии (t_α – коэффициент Стьюдента при доверительной вероятности α , S – стандартное отклонение, n – общее число измерений)

№	Происхождение кокаина	$\delta^{13}\text{CPDB}, \text{‰}$		$\Delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}, \text{‰}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}, \text{‰}$		$\Delta^{15}\text{N}_{\text{air}}, \text{‰}$
		EA-MS	GC-C-MS		EA-MS	GC-C-MS	
1	Колумбия, округ Коара	–35,47	–35,76	0,29	–2,19	–1,73	–0,46
2	Колумбия, деп. Сев. Сантандер	–36,14	–36,00	–0,14	–3,39	–2,62	–0,77
3	Колумбия, деп. Сев. Сантандер	–34,81	–34,54	–0,27	–5,60	–5,32	–0,28
4	Колумбия, деп. Сев. Сантандер	–35,82	–36,93	1,11	–6,10	–6,23	0,13
5	Колумбия, деп. Сев. Сантандер	–36,04	–35,86	–0,18	–3,70	–3,22	–0,48
6	Колумбия, деп. Сев. Сантандер	–35,72			–3,70		
7*	Колумбия, деп. Какета	–30,85'	–37,31	6,46'	–9,93'	–5,90	–4,03'
8*	Колумбия, деп. Какета	–35,46'	–36,49	1,03'	–3,69'	–1,64	–2,05'
9	Колумбия, деп. Уила	–35,51	–36,31	0,80	–4,88	–4,33	–0,55
10	Колумбия, деп. Кундина–Марка	–34,96	–34,84	–0,12	–9,71	–10,50	0,79
11	Колумбия, деп. Валье	–36,05	–36,08	0,03	–5,15	–7,14	1,99

12*	Колумбия, деп. Бойаха	-34,47'	-36,30	1,83'	-10,36'	-8,93	-1,43'
13	Колумбия, деп. Гауйяр	-34,88			-4,53		
14*	Колумбия	-35,84	-36,38	0,54	-3,09'	-1,96	-1,03'
15*	Колумбия	-39,92'	-35,53	-4,39'	-5,24	-4,63	-0,61
Среднее $\pm t_{\alpha} S / \sqrt{n}$ ($\alpha=0,95$)		-35,48 \pm 0,32	-36,03 \pm 0,46	0,55	-4,77 \pm 1,2	4,93 \pm 1,7	0,16

' – величины не учитывались при расчете средних значений вследствие присутствия посторонних примесей в пробе;

* – образцы, в которых присутствовали примеси

$$\Delta^{13}C_{PDB} = \delta^{13}C_{PDB}(EA-MS) - \delta^{13}C_{PDB}(GC-C-MS) \quad (11.2)$$

$$\Delta^{15}N_{air} = \delta^{15}N_{air}(EA-MS) - \delta^{15}N_{air}(GC-C-MS) \quad (11.3)$$

При получении этих данных учитывали, что элементный анализатор позволяет сжигать навески до 10 мг и более. Для проведения изотопного анализа азота с помощью элементного анализатора требуются пробы наркотических веществ массой 1 мг. Чистоту исследуемых образцов проверяли на хромато-масс-спектрометре HP-5973. Результаты определения изотопных отношений углерода и азота кокаина с помощью элементного анализатора и хромато-масс-спектрометра, помеченные звездочкой в таблице 11.3, соответствуют образцам кокаина, загрязненным посторонними примесями. Значения изотопных отношений, помеченные в таблице 11.3 знаком ', не учитывались при расчете средних величин. Как видно из таблицы 11.3, для чистого кокаина из Колумбии средние значения $\delta^{13}C_{PDB}$, определенные разными методами, отличаются незначительно (в пределах 0,55‰). При этом изотопный состав углерода, определенный с помощью элементного анализатора, был сдвинут в сторону более тяжелых масс по сравнению с результатами, полученными методом хромато-масс-спектрометрии. Различие между средними величинами азота $\delta^{15}N_{air}$, определенными двумя методами, было еще меньше (0,16‰). Результаты, приведенные в статье [8] для диацетилморфина, были хуже: различие в значениях $\delta^{15}N_{air}$ для двух методов составляло 0,49‰. Такое различие в результатах измерения изотопного состава азота двумя методами в статье никак не объясняется. Кроме того, из таблицы 11.3 видно, что применение больших концентраций наркотических веществ (20 мг/мл) при определении изотопных соотношений азота, приводящих к перегрузке капиллярной колонки, не вызывает фракционирования изотопов азота и углерода. Количество углерода в пробе при этом составляет 3×10^{-6} г.

Согласно таблице 11.3 при доверительной вероятности 0,95 образцы кокаина из различных регионов Колумбии имеют среднее значение изотопных отношений $\delta^{13}C_{PDB} = -35,48 \pm 0,32$ ‰ и $\delta^{15}N_{air} = -4,77 \pm 1,2$ ‰. Сравнение полученных результатов с данными статьи [6] показало, что по изотопному составу углерода получено различие примерно в 1‰, а по изотопному составу азота различия практически нет. Полученные расхождения в результатах измерения изотопных соотношений углерода могут быть

объяснены либо особенностями пробоподготовки образцов, приводящей к фракционированию изотопов углерода, либо недостаточной чистотой анализируемых проб. В работе [6] также показано, что, несмотря на близкие климатические условия произрастания растений коки в различных регионах Южной Америки, по изотопному составу углерода и азота можно различить образцы кокаина из Колумбии, Боливии, Перу и Эквадора.

Полученные результаты определения изотопных отношений углерода и азота листьев конопли, кокаина, героина, морфина показывают, что сопоставление изотопных соотношений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ позволяют выявлять географические источники наркотических веществ.

Для определения изотопных отношений углерода и азота чистых наркотических веществ можно применять любой из двух методов: элементный анализ в сочетании с масс-спектрометрией или хромато-масс-спектрометрию. В то же время при изотопном анализе загрязненных образцов необходимо использовать только метод хромато-масс-спектрометрии, позволяющий выделять и анализировать конкретные соединения.

Определение изотопных соотношений $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ и $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ твердых и жидких проб можно проводить на изотопном масс-спектрометре Финниган МАТ Дельта Плюс (фирма «Финниган», США), соединенном с газовым хроматографом HP 6890 (фирма «Хьюлетт-Паккард», США) с помощью блока Комбасшеон 3 (конфигурация для хромато-масс-спектрометрии) или с элементным анализатором EA 1110 (фирма «СЕ Инструментс», США) с помощью соединительного блока ConFlow 2 (конфигурация для элементного анализа).

В конфигурации для хромато-масс-спектрометрии растворенные пробы наркотиков вводили в капиллярную колонку DB-5 (фирма J&W Scientific, США) длиной 30 м и диаметром 0,32 мм. Условия анализа были следующими: газ-носитель гелий, температура узла ввода проб 250°C , начальная температура термостата колонок 150°C , конечная температура 320°C , скорость нагрева $10^\circ\text{C}/\text{мин}$. После разделения пробы ее отдельные компоненты поочередно попадали в окислительный реактор, где превращались в CO_2 , N_2 , оксиды азота и H_2O на катализаторах CuO , NiO , Pt при температуре 940°C . Оксиды азота восстанавливались в восстановительном реакторе при температуре 600°C на медной проволоке. Воду выводили из системы через полупроницаемую мембрану Nafion. При определении изотопных отношений азота CO_2 вымораживали в ловушке с жидким азотом. Через соединительную систему (открытая щель) газы попадали в масс-спектрометр, с помощью которого измеряли изотопный состав.

При изотопном анализе в с помощью элементного анализатора твердые образцы наркотиков сначала превращали в чистые газы N_2 , оксиды азота, CO_2 и H_2O путем сжигания в окислительном реакторе при температуре 1020°C , а затем восстанавливали оксиды азота в восстановительном реакторе при температуре 650°C . Воду удаляли из потока газа-носителя He в ловушке с перхлоратом магния. Далее азот и диоксид углерода разделяли на капиллярной колонке PoraPlot Q при температуре 50°C . Разделенные газы через блок ConFlow 2 поступали в ионный источник изотопного масс-спектрометра для проведения изотопного анализа.

Градуировку масс-спектрометра проводили по международным стандартным газам N_2 , CO_2 с известным изотопным составом, а также по международному стандарту масла NBS 22 и соединению KNO_3 (IAEA-NO-3) при работе с элементным анализатором.

Перед проведением анализа серии образцов установку готовили к работе путем многократного напуска стандартных газов N_2 , CO_2 в масс-спектрометр до получения воспроизводимых изотопных соотношений в пределах не хуже 0,10‰. При определении изотопного состава азота и углерода в образце импульсно напускали стандартный газ в масс-спектрометр непосредственно перед измерением аналитического пика и после его измерения. По первому стандартному пику и аналитическому сигналу рассчитывали изотопный состав пробы, а второй стандартный пик служил для контроля неизменности условий анализа в процессе измерения. Анализировали листья конопли, героин, морфин, кокаин. Образцы героина и кокаина имели степень очистки 60–100%. Одну часть образцов в виде порошка анализировали с использованием элементного анализатора, а другую часть растворяли в метаноле (фирма Merck) и анализировали с использованием капиллярного хроматографа.

Образцы листьев конопли были отобраны из различных регионов России (Брянская, Курская области, Мордовская, Татарская, Кабардино-Балкарская Республики, Приморский край, Ставропольский край) и Украины (Сумская область). Перед анализом листья конопли высушивали при температуре 50° С и измельчали в агатовой ступке до получения однородного порошка. Необходимые для анализа навески проб взвешивали на аналитических весах Mettler AT 261. Анализ изотопного состава таких образцов проводили с использованием элементного анализатора.

Во всех образцах концентрация углерода существенно превышала концентрацию азота. Например, на один атом азота в молекуле кокаина и морфина приходится 17 атомов углерода, а в героине – 21 атом углерода. Поэтому при определении изотопного состава азота необходимая навеска материала листьев конопли и порошков наркотических средств была достаточно большой и составляла 0,5–1,5 мг, а при определении изотопного состава углерода навеска образца не превышала 0,5 мг. Концентрация наркотических веществ, растворенных в метаноле, была 2 мг/мл при определении изотопного состава углерода и 18–20 мг/мл при определении изотопного состава азота. Пробу объемом 1 мкл вводили в хроматограф с использованием автодозатора A200S. Каждый образец анализировали не менее трех раз.

Отнесение пиков на хроматограммах героина, кокаина и морфина, зарегистрированных на изотопном масс-спектрометре Delta Plus (детектирование по ионам с массой 44 и 28), проводили с использованием времен удерживания, полученных с помощью хромато-масс-спектрометра HP 5973 в тех же условиях хроматографии.

Таким образом были проанализированы 15 образцов кокаина, 5 образцов героина и 1 образец морфина из Колумбии, три образца героина из Кореи, один образец героина из Афганистана и 8 образцов листьев конопли из России и Украины [13].

Литература

1. Chang C.C.Y, Kendall C., Silva R.S., Battaglin W.A., Campbell D. H., Nitrate stable isotopes: tools for determining nitrate sources among different land used in Mississippi river basin, Can. J. Fish. Aquat. Sci., 2002, vol. 59, pp. 1874-1885.
2. Rossmann A., Determination of stable isotope ratios in food analysis, Food Reviews International, 2001, vol. 17, pp. 347-381.

3. Ben-David M., Flynn R.W., Schell D.M., Annual and seasonal changes in diets of martens: evidence from stable isotope analysis, *Oecologia*, 1977, vol. 111, pp. 280-291.
4. Vogel J.C., Eglington B., Auret J.M., Isotope fingerprints in elephant bone and ivory, *Nature*, 1990, vol. 346, pp. 747-749.
5. Ehleringer J.R., Cooper D.A., Lott M.J., Cook C.S., Geo-Location of heroin and cocaine by stable isotope ratios, *Forensic Science International*, 1999, vol. 106, pp. 27-35.
6. Галимов Э.М., Природа биологического фракционирования изотопов, М.: Наука, М., 1981.
7. Besacier F., Guilluy R., Brazier J.L., Chaudron-Thozet H., Girard J., Lamotte A., Isotopic analysis of ^{13}C as a tool for comparison and origin assignment of seized heroin samples, *J. Forensic Sci.*, 1997, vol. 42, pp. 429-433.
8. Besacier F., Chaudron-Thozet H., Lascaux F., Rousseau-Tsangaris M., Application of gas chromatography--nitrogen isotopic mass-spectrometry to the analysis of drug samples, *Analusis*, 1999, vol. 27, pp. 213-217.
9. Ehleringer J.R., Casale J.F., Lott M.J., Ford M.V., Tracing the geographical origin of cocaine, *Nature*, 2000, vol. 408, pp. 311-312.
10. Desage M., Guilluy R., Brazier L.J., Gas chromatography with mass spectrometry or isotope-ratio mass spectrometry in studying the geographical origin of heroin, *Analytica Chimica Acta*, 1991, vol. 247, pp. 249-254.
11. Hays P.A., Remaud G.S., Jamin E., Martin Y.-L., Geographic origin determination of heroin and cocaine using site-specific isotopic ratio deuterium NMR *J. Forensic Sci.*, 2000, vol. 45, pp. 552-562.
12. Finnigan MAT, Application Flash Report N.15, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ by EA-IRMS, Forensic studies using the ConFlow interface.
13. Галимов Э.М., Севастьянов В.С., Кульбачевская Е.В., Голявин А.А., Идентификация географического места происхождения наркотических веществ на основе изотопного анализа углерода и азота, *Масс-спектрометрия*, 2004, Т. 1, No 1, С.31.

Приложение 1

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И
СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРИКАЗ

от 27 января 2006 г. N 40

«ОБ ОРГАНИЗАЦИИ ПРОВЕДЕНИЯ
ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ПРИ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ НАЛИЧИЯ
В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА АЛКОГОЛЯ, НАРКОТИЧЕСКИХ
СРЕДСТВ, ПСИХОТРОПНЫХ И ДРУГИХ
ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ»

В целях совершенствования порядка проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов приказываю:

1. Утвердить:

1.1. Положение об организации работы химико-токсикологической лаборатории наркологического диспансера (наркологической больницы) согласно приложению N 1.

1.2. Рекомендации по организации работы по отбору, транспортировке и хранению биологических объектов для проведения химико-токсикологических исследований на наличие алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов согласно приложению N 2.

1.3. Рекомендуемый перечень оборудования и вспомогательных материалов для химико-токсикологической лаборатории наркологического диспансера (наркологической больницы) согласно приложению N 3.

1.4. Рекомендуемый перечень необходимых реактивов для химико-токсикологической лаборатории наркологического диспансера (наркологической больницы) согласно приложению N 4.

1.5. Учетную форму N 450/у-06 «Журнал регистрации отбора биологических объектов» согласно приложению N 5.

1.6. Инструкцию по заполнению учетной формы N 450/у-06 «Журнал регистрации отбора биологических объектов» согласно приложению N 6.

1.7. Учетную форму N 452/у-06 «Направление на химико-токсикологические исследования» согласно приложению N 7.

1.8. Инструкцию по заполнению учетной формы N 452/у-06 «Направление на химико-токсикологические исследования» согласно приложению N 8.

1.9. Учетную форму N 451/у-06 «Справка о доставке биологических объектов на химико-токсикологические исследования» согласно приложению N 9.

1.10. Инструкцию по заполнению учетной формы N 451/у-06 «Справка о доставке биологических объектов на химико-токсикологические исследования» согласно приложению N 10.

1.11. Учетную форму N 454/у-06 «Справка о результатах химико-токсикологических исследований» согласно приложению N 11.

1.12. Инструкцию по заполнению учетной формы N 454/у-06 «Справка о результатах химико-токсикологических исследований» согласно приложению N 12.

1.13. Учетную форму N 453/у-06 «Журнал регистрации результатов химико-токсикологических исследований» согласно приложению N 13.

1.14. Инструкцию по заполнению учетной формы N 453/у-06 «Журнал регистрации результатов химико-токсикологических исследований» согласно приложению N 14.

1.15. Отчетную форму N 59 «Отчет о работе химико-токсикологической лаборатории наркологического диспансера (наркологической больницы)» согласно приложению N 15.

1.16. Инструкцию по заполнению отчетной формы N 59 «Отчет о работе химико-токсикологической лаборатории наркологического диспансера (наркологической больницы)» согласно приложению N 16.

2. Установить, что:

– организационно-методическое и научно-исследовательское обеспечение химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов осуществляется Центральной химико-токсикологической лабораторией при кафедре аналитической и судебно-медицинской токсикологии факультета последипломного профессионального образования провизоров Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования Мос-

ковская медицинская академия имени И.М. Сеченова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию;

– подготовка и повышение квалификации специалистов по аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов осуществляется кафедрой аналитической и судебно-медицинской токсикологии факультета последипломного профессионального образования провизоров Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования Московская медицинская академия имени И.М. Сеченова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию.

Министр
М.Ю. ЗУРАБОВ

Приложение N 1
к Приказу
Министерства здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
от 27.01.2006 N 40

ПОЛОЖЕНИЕ ОБ ОРГАНИЗАЦИИ РАБОТЫ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ НАРКОЛОГИЧЕСКОГО ДИСПАНСЕРА (НАРКОЛОГИЧЕСКОЙ БОЛЬНИЦЫ)

1. Химико-токсикологическая лаборатория наркологического диспансера (наркологической больницы) (далее – ХТЛ) является структурным подразделением наркологического диспансера или наркологической больницы.
2. ХТЛ организуется для проведения химико-токсикологических исследований биологических жидкостей организма человека (кровь, моча, слюна) на наличие алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов, а также альтернативных объектов (смывы с поверхности кожи, волосы, ногти и пр.) на наличие наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов (далее – биологические объекты).
3. ХТЛ возглавляется заведующим, который подчиняется главному врачу наркологического диспансера (наркологической больницы).
4. Штаты ХТЛ укомплектовываются врачами, провизорами, специалистами с немедицинским образованием, допущенными к занятию должности врача клинической лабораторной диагностики в установленном порядке, имеющими сертификат по специальности «Клиническая лабораторная диагностика» и прошедшими дополнительную подготовку по аналитической токсикологии наркотических средств, психотропных и других токсических веществ.
5. ХТЛ располагается в отдельном, изолированном помещении, исключающем доступ посторонних лиц и отвечающем требованиям техники безопасности при работе персонала в ХТЛ и санитарно-гигиеническим требованиям, обеспечивающим выполнение возложенных на нее задач. ХТЛ оснащается необходимым оборудованием, оргтехникой, инвентарем, реактивами, справочной литературой, нормативно-технической документацией, средствами связи и охранной сигнализацией.
6. ХТЛ осуществляет следующие функции:
 - 6.1. Прием в установленном порядке на химико-токсикологические исследования биологических объектов.
 - 6.2. Хранение биологического объекта для повторных химико-токсикологических исследований в течение двух месяцев с соблюдением установленных для этого требований.
 - 6.3. Проведение химико-токсикологических исследований принятых биологических объектов на наличие алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов. Ведение рабочего журнала проводимых исследований в произвольной форме с описанием биологического объекта и результатов.
 - 6.4. Оформление результатов химико-токсикологических исследований о наличии (отсутствии) в исследуемых биологических объектах алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов по установленной форме.

6.5. Выдача Справок о результатах химико-токсикологических исследований биологических объектов (учетная форма N 454/у-06).

7. В ХТЛ используются бланки Справок о результатах химико-токсикологических исследований (учетная форма N 454/у-06) и штамп с наименованием наркологического диспансера (наркологической больницы), ведется учет и отчетность по формам, утвержденным в установленном порядке.

8. Штатная численность персонала ХТЛ устанавливается руководителем наркологического диспансера (наркологической больницы) с учетом рекомендованных штатных нормативов и объема проводимых химико-токсикологических исследований.

9. Контроль за деятельностью ХТЛ, расходом реагентов и правильным использованием оборудования осуществляется руководителем (заместителем руководителя) наркологического диспансера (наркологической больницы), структурным подразделением которого является ХТЛ.

Приложение N 2
к Приказу
Министерства здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
от 27.01.2006 N 40

**РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ОРГАНИЗАЦИИ РАБОТЫ
ПО ОТБОРУ, ТРАНСПОРТИРОВКЕ И ХРАНЕНИЮ БИОЛОГИЧЕСКИХ
ОБЪЕКТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ НА НАЛИЧИЕ АЛКОГОЛЯ И ЕГО СУРРОГАТОВ,
НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ, ПСИХОТРОПНЫХ И ДРУГИХ
ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОПЬЯНЕНИЕ
(ИНТОКСИКАЦИЮ), И ИХ МЕТАБОЛИТОВ**

1. Настоящие рекомендации предназначены для организации работы по отбору, транспортировке и хранению биологических объектов для проведения химико-токсикологических исследований на наличие алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов и распространяются на медицинские организации, в которых проводится медицинское освидетельствование на состояние опьянения и (или) диагностика факта употребления алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов.

2. Рекомендации по отбору крови:

Отбор крови у освидетельствуемого проводится на рабочем месте, которое оборудуется в соответствии с требованиями, предъявляемыми к оборудованию процедурного кабинета. Отбор крови проводится в резиновых перчатках, с соблюдением правил асептики, обработкой перчаток перед каждым отбором дезинфицирующим раствором, не содержащим спирт.

Перед проколом кожа освидетельствуемого обрабатывается стерильным тампоном (шариком из ваты), смоченным не содержащим спирт дезинфицирующим раствором. После взятия крови к раневой поверхности прикладывается новый стерильный тампон, смоченный таким же дезинфицирующим раствором.

Стерильные тампоны следует хранить в упаковке из бумаги, в количестве не более 20 штук. Стерильные лабораторные инструменты хранятся в той же упаковке, в которой проводилась их стерилизация.

Кровь для проведения химико-токсикологических исследований отбирается из поверхностной вены одним из следующих способов:

Самотеком в сухой флакон с раствором гепарина (3 – 5 капель на каждые 10 мл крови). Отбирается 15 мл крови в два флакона объемами 10 и 5 мл. Флаконы закрываются стандартной резиновой пробкой, которая фиксируется алюминиевым колпачком. Содержимое флаконов сразу же перемешивается. Флаконы печатываются и направляются в ХТЛ для проведения химико-токсикологических исследований на наличие алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов. Флакон с 5 мл крови хранится как контрольный образец. Второй флакон с 10 мл крови (анализируемый образец) используется для проведения химико-токсикологических исследований.

С использованием вакуумных пробирок (одноразовых устройств для ускоренного взятия крови с содержанием гепарина и иглами с двух концов) один конец вводится в вену, другим кон-

цом прокалывается резиновая мембрана пробирки. Отбирается 15 мл крови в две вакуумные пробирки по 5 мл и 10 мл (контрольный и анализируемый образцы), пробирки печатаются. Для химико-токсикологических исследований на наличие алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов обеспечивается доставка образцов крови в ХТЛ не позднее двух суток после отбора. Кровь после отбора до момента отправки в ХТЛ хранится в холодильнике при температуре 0 – 2 град. С.

Кровь с сопроводительной документацией направляется в ХТЛ в укупоренных и опечатанных флаконах, вакуумных пробирках в специальном контейнере в сумке-холодильнике на транспорте медицинской организации в сопровождении медицинского работника, ответственного за доставку биологических объектов.

3. Рекомендации по отбору жидкости полости рта:

Отбор жидкости полости рта (далее – слюна) проводится с использованием коллекторов, содержащих хлопковый тампон из стоматологической (хирургической) ваты. Хлопковый тампон помещается под язык на 10 минут без стимуляции слюноотделения. После того как тампон пропитается слюной, он помещается в коллектор, закрытый герметично пластмассовой пробкой, коллектор печатается и направляется с сопроводительной документацией в ХТЛ в специальном контейнере в сумке-холодильнике на транспорте медицинской организации в сопровождении медицинского работника, ответственного за доставку биологических объектов.

4. Рекомендации по отбору мочи:

Отбор мочи производится в условиях, исключающих возможность замены или фальсификации биологического объекта.

Моча собирается освидетельствуемым в стеклянный или пластмассовый градуированный сосуд с широким горлом объемом до 200 мл в количестве до 100 мл, но не менее 30 мл. Освидетельствуемый передает сосуд с мочой медицинскому персоналу. Сосуд с мочой накрывается покровной пластиной (крышкой).

В течение первых 5 минут проводится предварительное исследование мочи, включающее определение следующих показателей:

температуры (не более чем через 4 минуты после отбора мочи) стеклянным ртутным термометром (в норме температура находится в пределах 32,5 – 37,7 град. С);

рН с помощью универсальной индикаторной бумаги для определения рН мочи (в норме рН мочи в интервале 4 – 8 ед. рН);

относительной плотности (в норме относительная плотность в пределах 1.008 – 1.025);

содержания креатинина методом иммунной хроматографии – иммунохроматографическими тестами (в норме содержание креатинина 4,4 – 17,7 ммоль/сут).

Если при предварительном исследовании выявляется несоответствие указанных в настоящем пункте показателей их нормам, проводится повторный отбор мочи. Результаты предварительного исследования фиксируются в графе 9 Журнала регистрации отбора биологических объектов (учетная форма N 450/у-06).

После проведения предварительных исследований мочу делят на две части (1/3 и 2/3 общего объема) и помещают их в два стеклянных или пластмассовых герметично закрывающихся контейнера объемом 100 мл каждый. Первый контейнер с меньшим количеством мочи хранится как контрольный образец. Второй (анализируемый образец) используется для проведения химико-токсикологических исследований.

Для контрольного образца мочи используются контейнеры с контролем первого вскрытия.

При направлении мочи для проведения химико-токсикологических исследований на наличие алкоголя, его суррогатов и метаболитов моча после разделения отбирается из контейнера с анализируемым образцом в чистый сухой флакон объемом 10 мл в количестве не менее 5 мл, закрывается резиновой пробкой, фиксируется алюминиевым колпачком и укупоривается под обкатку.

Для проведения химико-токсикологических исследований на наличие алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов моча доставляется в ХТЛ не позднее двух суток после отбора, до отправки в ХТЛ моча хранится в холодильнике при температуре 0–2 град. С.

Отобранная моча с сопроводительной документацией доставляется в ХТЛ в укупоренных и опечатанных контейнерах в сумке-холодильнике на транспорте медицинской организации медицинским работником, ответственным за доставку биологических объектов.

5. Рекомендации по отбору волос:

Волосы срезаются ближе к коже ножницами с закругленными концами отдельно с лобной, теменной, затылочной, правой и левой височных областей волосистой части головы. При невозможности отбора волос с волосистой части головы (облысение), волосы срезаются с подмышечных впадин или лобковой области.

Для проведения химико-токсикологических исследований отбирается не менее 300 мг волос. Отобранные образцы волос делятся на две равные части, заворачиваются в фольгу, каждая часть помещается в отдельный конверт с соответствующими надписями: контрольный и анализируемый образцы. Конверты опечатываются и хранятся в сухом месте при температуре 20–25 град. С до отправки в ХТЛ.

6. Рекомендации по отбору ногтей:

Ногти обрезаются ножницами с закругленными концами с рук или ног ближе к коже. Отобранные образцы ногтей упаковываются и отправляются в ХТЛ аналогично образцам волос.

7. Рекомендации по отбору потожировых выделений:

Отбор смывов с поверхности кожи для проведения химико-токсикологических исследований на наличие каннабиноидов производится ватным тампоном, смоченным спиртом. Вес тампона – 400–500 мг при расходе этанола до 1 мл. Тампоном тщательно протираются поверхности рук и лица (главным образом вокруг рта), после чего тампон высушивается на воздухе. После высушенный тампон упаковывается в отдельный полиэтиленовый пакет. Все полученные пакеты с объектами помещаются в один общий конверт, который опечатывается.

8. Рекомендации по подготовке биологических объектов и документации к транспортировке в ХТЛ:

Для отобранных биологических объектов готовятся две этикетки, одна из которых предназначена для контрольного образца, другая для анализируемого. На этикетках указывается штрих-код либо шестизначный код освидетельствуемого (для кодирования используется произвольный ряд чисел от 0 до 9, например: 003841, 658097 и т.д.), дата и код подразделения медицинской организации, в которой производится отбор биологических объектов. На этикетке контрольного образца после шестизначного кода либо штрих-кода освидетельствуемого ставится буква «К» (например: 003841-К). Обратная сторона этикеток подписывается освидетельстуемым до указания на этикетках его штрих-кода либо шестизначного кода.

Заполнение этикеток проводится лицом, ответственным за ведение Журнала регистрации отбора биологических объектов (учетная форма N 450/у-06).

Каждая этикетка крепится к флакону (пробирке, контейнеру и пр.) клейкой лентой таким образом, чтобы исключить возможность подмены содержимого флакона без нарушения целостности этикетки. Место соединения концов ленты пломбируется и опечатывается с использованием штампа структурного подразделения медицинской организации, в которой проводился отбор биологических объектов.

Подготовленные биологические объекты упаковываются в контейнер и с сопроводительной документацией помещаются в сумку-холодильник.

9. Рекомендации по транспортировке биологических объектов и документации в ХТЛ:

Транспортировку биологических объектов и документации осуществляет лицо, на имя которого составлена Справка о доставке биологических объектов на химико-токсикологические ис-

следования (учетная форма N 451/y-06). Данное лицо обеспечивает сохранность биологических объектов и документации во время транспортировки.

Об отправке биологических объектов и документации уведомляется ХТЛ с использованием имеющихся средств связи.

10. Передачу биологических объектов и документов в ХТЛ рекомендуется осуществлять следующим образом:

доставленные биологические объекты и документацию принимает заведующий ХТЛ; заведующий ХТЛ производит наружный осмотр целостности упаковки и соответствие биологических объектов их сопроводительной документации;

все сведения по приемке биологических объектов регистрируются в Справке о доставке биологических объектов на химико-токсикологические исследования (учетная форма N 451/y-06) и Журнале регистрации результатов химико-токсикологических исследований (учетная форма N 453/y-06).

11. Контрольные образцы биологических объектов при поступлении в ХТЛ сразу же помещаются на хранение в запираемые или опечатываемые холодильные шкафы и хранятся при температуре не менее минус 18 град. С. Срок хранения контрольного образца – 2 месяца со дня поступления в ХТЛ. Если в течение этого срока отсутствовала необходимость в повторных химико-токсикологических исследованиях, то по истечении 2-х месяцев контрольный образец биологического объекта уничтожается.

12. Анализируемые образцы биологических объектов при поступлении в ХТЛ хранятся в течение первых двух суток при температуре 0 – 2 град. С, далее – при температуре не менее минус 18 град. С в запираемых или опечатываемых холодильных шкафах.

Приложение N 3
к Приказу
Министерства здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
от 27.01.2006 N 40

РЕКОМЕНДУЕМЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ОБОРУДОВАНИЯ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ НАРКОЛОГИЧЕСКОГО ДИСПАНСЕРА (НАРКОЛОГИЧЕСКОЙ БОЛЬНИЦЫ)

Общелабораторное оборудование и вспомогательные материалы

N п/п	Наименование оборудования и вспомогательных материалов	Количество единиц
1	Микротермостат 4 – 6 гнездный, температура 60 – 100 град. С	1
2	Термостат	1
3	Дистиллятор	1
4	Испаритель ротационный (комплект 250 мл)	1
5	Кристаллизатор стеклянный объемом 20, 50, 100 мл	2
6	Ультразвуковая баня объемом 3 л	1
7	Вибромиксер объемом 10 – 15 мл	1
8	Весы аналитические электронные (2 класс точности 0,0001 – 0,00001 г)	1
9	Центрифуга с охлаждением (не менее 6 тыс. об/мин.) с переменными роторами и адаптерами объемом 50, 30, 15, 2 мл	1
10	Шкаф сушильный с диапазоном температур 50 – 25 град. С	1
11	Пикнометры объемом 1, 2, 5, 10 мл	5
12	pH-метр (ионометр)	1
13	Дозатор для порошковых масс	1
14	Холодильник с морозильной камерой (до минус 40 град. С)	1
15	Бытовой холодильник с морозильной камерой (до минус 20 град. С)	3
16	Штатив лабораторный (комплект по 5 шт.)	3
17	Ступка агатовая объемом 9, 25, 50 мл с пестиком	по 2
Мерная посуда		
18	Колбы мерные объемом 25, 50, 100 мл	по 10
19	Пипетки объемом 0,1, 0,2, 1,0, 2,0, 5,0 и 10,0 мл	по 10
20	Стаканы химические объемом 50, 100, 250, 500 мл	по 3
21	Пробирки мерные с притертой пробкой на 5, 10, 25 мл	по 50
Лабораторное стекло		
22	Колба круглодонная объемом 1000 мл (шлиф 29)	3

23	Колба коническая объемом 250 мл	10
24	Воронка стеклянная для фильтрования диаметром 3, 6, 25 см	по 10
25	Воронки делительные объемом 50 и 100 мл	по 3
26	Пробирки стеклянные с притертой пробкой объемом 5, 10, 2 мл	по 10
27	Пробирки центрифужные стеклянные объемом 10 мл	50
28	Флаконы из дрота объемом 12 мл (пенициллиновые)	50
29	Флаконы (штанглазы) для реактивов объемом 50, 100, 250 мл	по 20
30	Флаконы (штанглазы) для реактивов объемом 500, 1000 мл	по 10
31	Колбы для ротационного испарителя объемом 25, 50, 100 мл	по 10
32	Фильтры стеклянные N 2, 3, 4	по 5
Вспомогательные материалы		
33	Шпатель	5
34	Пинцет анатомический	2
35	Пробоотборник – пипетка полиэтиленовая объемом 1,0 и 3,0	по 50
36	Фильтры бумажные диаметром 5,5 и 9 см	по 1
37	Капельницы (разные)	15
38	Карандаш восковой	10
39	Иглы одноразовые «Люер» 0625	40
40	Трубка силиконовая диаметром 4 – 6 мм (метров)	4

Рабочее место для газожидкостной хроматографии (ГЖХ)

N п/п	Наименование оборудования и вспомогательных материалов	Количество единиц
1	Комплекс аппаратно-программный для медицинских исследований на базе газового хроматографа с пламенно-ионизационным, термоионным, азотнофосфорным, электроннозахватным детекторами с устройством автоматического ввода анализируемой пробы и комплектом запасных частей и расходных материалов не менее чем на 2000 исследований	1 – 3
2	Генератор водорода (мощностью не менее 4 атм. с обеспечением водородом марки А)	1
3	Компрессор воздуха (обеспечение воздухом, класс загрязненности 1)	1
4	Колонка для анализа алкоголя и его суррогатов	3
5	Колонка для анализа наркотических средств, психотропных и других токсических веществ	4
6	Микрошприцы для устройств автоматического ввода пробы объемом 10 мкл	10
7	Микрошприцы для ручного ввода пробы объемом 5 мкл	10
8	Вials объемом 2 мл под кримпер (под обкатку) темного стекла с крышками и этикетками	1000

9	Вставки в вials объемом 250 мкл	2000
10	Кримпер	1
11	Вials объемом 2 мл с закручивающимися крышками	1000
12	Дозатор пипеточный переменного объема 10–100 мкл с наконечниками (2000 шт./уп.)	1
13	Дозатор пипеточный переменного объема 100–1000 мкл с наконечниками (2000 шт./уп.)	1
14	Пробирки для экстракции с солевой фракцией и составом растворителей для извлечения веществ кислого и основного характера	100
15	Колпачки алюминиевые для концентрирования проб выпариванием	500
16	Стеклянные выпарительные чашки объемом 5 мл с конусным дном	50
17	Азот особой чистоты (баллон)	1
18	Поддерживающие нагревательные устройства для концентрирования в выпарительных чашках и алюминиевых колпачках	2
19	Гелий (баллон)	2
20	Редуктор газовый (150/25 атм.)	2

Рабочее место для хроматомасс-спектрометрии (ГХ/МС)

№ п/п	Наименование оборудования и вспомогательных материалов	Количество единиц
1	Комплекс аппаратно-программный для медицинских исследований на базе газового хроматографа с масселективным детектором с устройством автоматического ввода анализируемой пробы и комплектом запасных частей и расходных материалов не менее чем на 2000 исследований и библиотеками масс-спектров на 6000 соединений	1
2	Колонка для анализа алкоголя и его суррогатов	3
3	Колонка для анализа наркотических средств, психотропных и др. токсических веществ	4
4	Микрошприцы для ручного ввода пробы объемом 5 мкл	10
5	Газоплотный шприц для устройств автоматического ввода пробы объемом 100 мкл	5
6	Нагревательное устройство для вials, обеспечивающее температуру в диапазоне 50 – 70 град. С	1
7	Система для твердофазной экстракции на 12 позиций с вакуумным мембранным насосом (вакуум 15 – 20 мм рт.ст.)	1
8	Патроны для твердофазной экстракции (сорбент с привитой фазой С-18)	200
9	Вials объемом 2 мл под кримпер (под обкатку) темного стекла с крышками и этикетками	1000
10	Вials объемом 2 мл с закручивающимися крышками	1000
11	Вставки в вials объемом 250 мкл	2000

12	Кримпер	1
13	Дозатор пипеточный переменного объема 0,5 – 10,0 мкл с наконечниками (2000 шт./уп.)	1
14	Дозатор пипеточный переменного объема 10 – 100 мкл с наконечниками (2000 шт./уп.)	1
15	Дозатор пипеточный переменного объема 100 – 1000 мкл с наконечниками (2000 шт./уп.)	1
16	Гелий (баллон)	2
17	Термостатируемый вакуумный концентратор с центрифугой и ротором объемом 5 – 10 мл	1

Рабочее место для тонкослойной хроматографии (ТСХ)

№ п/п	Наименование оборудования и вспомогательных материалов	Количество единиц
1	Камера хроматографическая (10 x 10 см)	4
2	Камера хроматографическая (20 x 20 см)	2
3	Распылитель компрессорный	5
4	Пульверизатор	5
5	Камера для опрыскивания окрашенным веществом с установочным столиком	1
6	Нагревательное устройство для сушки пластин (температура 60 – 65 град. С)	1
7	Фен электрический	1
8	Облучатель хроматографический УФС-254/365 (длины волн 254, 365 нм)	1
9	Пластины для ТСХ УФ-254 (15 x 15 см 20 шт./уп.)	5
10	Пластины для ВЭТСХ (5 x 5, 10 x 10 см по 50 шт./уп.)	5
11	Апликатор для нанесения проб	1
12	Денситометр для анализа пластин	1
13	Капилляры стеклянные объемом 2 – 25 мкл	500
14	Микрошприцы объемом 10, 50, 100 мкл	по 2
15	Чашка стеклянная с конусным дном для концентрирования и упаривания органических экстрактов объемом 5 мл	25
16	Унифицированные системы тонкослойной хроматографии для проведения скрининга веществ кислого и основного характера	2
17	Специализированные системы для тонкослойной хроматографии бензодиазепинов	1
18	Специализированные системы для тонкослойной хроматографии опиатов	1
19	Специализированные системы для тонкослойной хроматографии каннабиноидов	1

Рабочее место для высокоэффективной жидкостной хроматографии

N п/п	Наименование оборудования и вспомогательных материалов	Количество единиц
1	Комплекс аппаратно-программный для медицинских исследований на базе жидкостного хроматографа в комплектации с 2-насосной системой, устройством автоматического ввода анализируемой пробы, термостатированием, многоволновым спектрофотометрическим детектированием (либо диодная матрица), микроколоной и комплектом запасных частей и расходных материалов на 2000 исследований	1
2	Тестовая хроматографическая колонка (диаметром 2 x 75 мм с Prontosil, C-18,5 мкм)	1
3	Рабочая хроматографическая колонка (диаметром 2 x 75 мм с Prontosil, C-18,5 мкм)	3
4	Деионизатор воды	1
5	Устройство для фильтрования образцов объемом 10, 25, 0,5 мл	по 2
6	Мембраны фильтровальные пористостью 0,45 мкм (100 шт./уп.)	20
7	Стеклянные пробирки объемом 1, 2, 4 мл	по 50
8	Дозатор пипеточный одноканальный переменного объема 0,5 – 10, 5 – 40, 40 – 200, 200 – 1000, 1000 – 5000 мкл с наконечниками (2000 шт./уп.)	по 1
9	Пробирка РЕ 3,5 с пробкой объемом 250 мкл (1000 шт./уп.)	2
10	Программное обеспечение с электронной библиотекой спектров на 100 и более психоактивных веществ	1

Рабочие места для иммунохимических исследований Рабочее место для иммуноферментного анализа (ИФА)

N п/п	Наименование оборудования и вспомогательных материалов	Количество единиц
1	Комплекс аппаратно-программный для медицинских исследований (анализатор автоматический) методом гетерогенного иммуноферментного анализа с комплектом запасных частей и расходных материалов на 500 исследований	1
2	Планшетный фотометр (многолучевой)	1
3	Шейкер (встряхиватель) для ИФА	1
4	Промыватель планшетов (вошер)	1
5	Дозатор пипеточный одноканальный переменного объема 0,5 – 10, 5 – 40, 40 – 200, 200 – 1000, 1000 – 5000 мкл	по 1
6	Дозатор пипеточный восьмиканальный переменного объема 5 – 10, 50 – 200 мкл	по 1
7	Штатив для одноканальных пипеток-дозаторов	1

8	Штатив для восьмиканальных пипеток-дозаторов	1
9	Ванночка для реагентов, пластмассовая, объемом 20 мл	10
10	Наконечники к пипеткам-дозаторам объемом 5 – 200, 200 – 1000, 1000 – 5000 мкл (1000 шт./уп.)	по 1
11	Наконечники к восьмиканальным пипеткам-дозаторам, 5 – 50, 50 – 200 мкл (1000 шт./уп.)	по 1
12	Планшет стрипованный на 96 лунок	10
13	Наборы диагностические для иммуноферментных исследований (ИФА) на основные группы наркотических средств и психотропных веществ	на 1000 измерений

Рабочее место для поляризационного флуороиммуноанализа

N п/п	Наименование оборудования и вспомогательных материалов	Количество единиц
1	Поляризационный флуориметр автоматический с комплектом запасных частей и расходных материалов	1
2	Карусель для анализа, для калибровки	4
3	Кювета стеклянная	1000
4	Катридж пластмассовый для исследуемого образца	1000
5	Дозатор пипеточный одноканальный переменного объема 5 – 40, 40 – 200, 200 – 1000, 1000 – 5000 мкл	по 1
6	Наконечники к пипеткам-дозаторам объемом 5 – 200, 200 – 1000, 1000 – 5000 мкл (1000 шт./уп.)	по 1
7	Штатив для одноканальных пипеток-дозаторов	1
8	Реагенты диагностические, калибраторы и контроли (стандарты) для поляризационного флуороиммуноанализа	на 1000 измерений

Рабочее место для иммунохроматографического анализа (ИХА)

N п/п	Наименование оборудования и вспомогательных материалов	Количество единиц
1	Иммунохроматографические (панели, тесты, полоски) для выявления наркотических средств, психотропных веществ и алкоголя в моче	на 1000 измерений
2	Пипетка пластиковая объемом 0,5 – 3,0 мл	100
3	Стакан химический объемом 10 мл	25
4	Компьютерный видеоцифровой рефлектометрический анализатор	1

Рабочее место для фотометрических исследований

N п/п	Наименование оборудования и вспомогательных материалов	Количество единиц
1	Спектрофотометр УФ-ВИД (регистрирующий)	1
2	Атомно-адсорбционный спектрофотометр	1
3	Флаконы (штанглазы) для реактивов объемом 100, 250 мл	по 10
4	Флаконы (штанглазы) для реактивов объемом 500, 1000 мл	по 5
5	Колбы мерные объемом 25, 50, 100 мл	по 5
6	Пипетки объемом 0,1; 0,2; 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 мл	по 5
7	Воронки для фильтрования диаметром 3 и 6 см	по 10
8	Воронки делительные объемом 50 и 100 мл	по 4
9	Пикнометры объемом 1, 2, 5, и 10 мл	по 5
10	Пробирки центрифужные объемом 10, 20 мл	20
11	Пробирки мерные с притертой пробкой объемом 5, 10, 25 мл	по 10
12	Дозатор для порошков	1
13	Фильтры стеклянные N 4	5
14	Насадка Бюхнера Ш29	5
15	Колба коническая объемом 250 мл (шлиф 29)	10
16	Стаканы химические объемом 50, 100, 250, 500 мл	по 5
17	Патроны для твердофазной экстракции (50 шт./уп.)	10
18	Штативы для пробирок	2

Приложение N 4
к Приказу
Министерства здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
от 27.01.2006 N 40

РЕКОМЕНДУЕМЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ
НЕОБХОДИМЫХ РЕАКТИВОВ ДЛЯ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ
ЛАБОРАТОРИИ НАРКОЛОГИЧЕСКОГО ДИСПАНСЕРА
(НАРКОЛОГИЧЕСКОЙ БОЛЬНИЦЫ)

N п/п	Наименование
1	Аммония ванадат «хч», «чда»
2	Аммония гидрат окиси 25% «чда»
3	Аммония молибдат «хч», «чда»
4	Аммония сульфат «хч», «чда»
5	Аммония сульфамат «хч», «чда»
6	Ацетилхолина гидрохлорид 0,2% в ампулах
7	Ацетон «хч», «чда»
8	Ацетонитрил «хч», «чда» «для ВЭЖХ, сорт 0 или 1»
9	Бензол «хч», «чда»
10	Бензидин «хч», «чда»
11	BSTFA + 1% TMCS bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide + 1% trimethylchlorosilane
12	Бромфеноловый синий (индикатор)
13	Висмута карбонат «хч», «чда»
14	Висмута нитрат основной «хч», «чда»
15	Вода очищенная
16	Гептан, нормальный, эталонный
17	Гексан «хч», «чда»
18	Гидроксиламин солянокислый «хч», «чда»
19	Глицерин «хч», «чда»
20	бета-глюкуронидаза Helix Potatia
21	Дихлорметан «хч», «чда»
22	Дихлорэтан «хч», «чда»
23	Диоксан «хч», «чда»
24	Дифениламин «хч», «чда»
25	Дифенилкарбазон «хч», «чда»
26	Железа окисного хлорид «хч», «чда»

27	Железа окисного нитрат «хч», «чда»
28	Йодистый метил
29	Йод кристаллический «хч», «чда»
30	Йодплатинат «хч», «чда»
31	Йодистый этил
32	Калия гидрат окиси «хч», «чда»
33	Калия йодид «хч», «чда»
34	Калия перманганат «хч», «чда»
35	Калия фосфат однозамещенный «хч», «чда»
36	Калия хлорид «хч», «чда»
37	Калия феррицианид «хч», «чда»
38	Калия бихромат «хч», «чда»
39	Кислота азотная «хч», «чда»
40	Кислота борная «хч», «чда»
41	Кислота лимонная «хч», «чда»
42	Кислота серная «хч», «чда»
43	Кислота соляная «хч», «чда»
44	Кислота трихлоруксусная «хч», «чда»
45	Кислота фосфорная «хч», «чда»
46	Кислота хлорная «хч», «чда»
47	Кислота щавелевая «хч», «чда»
48	Кислота уксусная «хч», «чда»
49	Кислота фосфорно-вольфрамовая «хч», «чда»
50	Кальция хлорид «хч», «чда»
51	Кобальта хлорид (или нитрат) «хч», «чда»
52	Лития гидроксид с содержанием не менее 98%
53	Магния хлорид «хч», «чда»
54	Магния сульфат «хч», «чда»
55	Меди сульфат «хч», «чда»
56	Метилстеарат с содержанием не менее 98%
57	MBTFA N-methyl-bis-triflyoroacetamide
58	MBTFA N-methyl-N-trimethylsilil-triftoracetamide
59	MTBSTFA N-tret-buthyldimethylsilil-N- methyltriftoracetamide
60	Мочевина «хч», «чда»
61	Натрия ацетат «хч», «чда»
62	Натрия гидрат окиси «хч», «чда»

63	Натрия гидрокарбонат «хч», «чда»
64	Натрия сульфат б/в «чда»
65	Натрия сульфит б/в «чда»
66	Натрия хлорид «хч», «чда»
67	Натрия тетратионид (гидросульфит) «ч»
68	Натрия тетраборат «хч», «чда»
69	Натрия фосфат 1-замещенный «хч», «чда»
70	Натрия фосфат 2-замещенный «хч», «чда»
71	Натрия цитрат «хч», «чда»
72	Натрия салицилат «хч», «чда»
73	Натрия нитрит «хч», «чда»
74	Натрия гидрат окиси «хч», «чда»
75	N-а-нафтилэтилендиамин «хч», «чда»
76	В-нафтол «хч», «чда»
77	Нингидрин «хч», «чда»
78	Бета-нафтол «хч», «чда»
79	ПАН (индикатор)
80	Перекись водорода 33%
81	Перхлорная кислота 70%
82	Петролейный эфир «чда»
83	Прочный синий Б (или ББ) «хч», «чда»
84	Полиэтиленгликоль 155 (ПЭГ-1500, карбовакс 1540)
85	PFPA Pentafluoropropionic anhydride
86	Ртуты окись желтая «хч», «чда»
87	Ртуты гидрохлорид «хч», «чда»
88	Ртуты нитрат «хч», «чда»
89	Ртуты сульфат «хч», «чда»
90	Сероуглерод «хч», «чда»
91	Спирт этиловый
92	Спирт метиловый
93	Спирт изо-пропиловый
94	Спирт н-пропиловый «чда»
95	Спирт изо-бутиловый «чда»
96	Спирт втор-бутиловый «чда»
97	Спирт н-бутиловый «чда»
98	Спирт трет-бутиловый «чда»
99	Спирт изо-амиловый «чда»

100	Спирт н-амиловый «чда»
101	Сквалан «чда»
102	Аналитические (стандартные) образцы наркотических средств, психотропных и других токсических веществ и их контроли
103	Серебра нитрат «хч»
104	Тетраметиламмоний гидроксид (порошок)
105	Толуол «хч», «чда»
106	Тритон X-100, (X-305)
107	1,2,3-трис-(2-циантокси)-пропан
108	Тетрахлорметан «чда»
109	Трихлорэтилен «чда»
110	Трифторуксусная кислота
111	TFAA trifluoroacetic anhydride трифторуксусный ангидрид
112	Уксусный ангидрид
113	Универсальный индикатор, pH 0 - 12, полоски
114	Формальдегид «чда»
115	Фурфурол «чда»
116	Хлороформ «хч», «чда»
117	2-хлорбутан «осч» «хч для ГХ» «хч», «чда»
118	Целит С-22 (или: целит-545, хромотон, инертон, хромосорб)
119	Этилацетат «хч», «чда»
120	Этиловый эфир уксусной кислоты «хч», «чда»
121	Эфир диэтиловый «для наркоза» ФС 42-3643-98

Примечание. При комплектации ХТЛ реактивами учитываются предъявляемые к ним требования, указанные в утвержденных в установленном порядке методиках и руководствах по эксплуатации соответствующего оборудования.

Приложение N 5
к Приказу
Министерства здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
от 27.01.2006 N 40

Министерство
здравоохранения и
социального развития
Российской Федерации

Медицинская документация
Учетная форма N 450/у-06

(Наименование медицинской
организации)

Журнал регистрации отбора биологических объектов

N п/п	Дата и время отбора биологи- ческого объекта	Освидетельствуемый <*>				Наименование направляющей организации
		ф.и.о. (полностью)	возраст	пол	род занятий	
1	2	3	4	5	6	7

Предвари- тельный клиничес- кий диагноз	Результаты предвари- тельного исследо- вания	Биологи- ческий объект, объем	Код биологи- ческого объекта	Дата и время напра- вления биологи- ческого объекта в ХТЛ	Приме- чание	Подпись освиде- тельств- уемого	Фамилия и инициалы, подпись ответс- твенного лица
8	9	10	11	12	13	14	15

<*> При кодировании (штрих-кодировании) код (штрих-код) освидетельствуемого указы-
ваются в графе 3.

Приложение N 6
к Приказу
Министерства здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
от 27.01.2006 N 40

ИНСТРУКЦИЯ ПО ЗАПОЛНЕНИЮ УЧЕТНОЙ ФОРМЫ N 450/У-06 «ЖУРНАЛ РЕГИСТРАЦИИ ОТБОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ»

1. Учетная форма N 450/у-06 «Журнал регистрации отбора биологических объектов» (далее – Журнал) ведется в структурных подразделениях медицинских организаций, в которых проводится медицинское освидетельствование на состояние опьянения и (или) диагностика факта употребления алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов (далее – Подразделение).

2. Журнал пронумеровывается, прошнуровывается и скрепляется печатью медицинской организации. Журнал хранится в сейфе.

Графы 1 – 13, 15 Журнала заполняются работником Подразделения, производящего отбор биологического объекта. Регистрация освидетельствуемых в Журнале начинается с 1 января каждого календарного года с N 1.

3. В графе 1 указывается порядковый номер регистрации отобранного для проведения химико-токсикологических исследований биологического объекта.

В графе 2 указывается дата и время отбора биологического объекта.

В графе 3 указываются фамилия и инициалы освидетельствуемого по документу, удостоверяющему личность. При анонимном обращении освидетельствуемого в графу 3 вносится его шестизначный код (штрих-код), а в графе 7 делается запись «обратился самостоятельно».

Графы 4, 5 и 6 заполняются со слов освидетельствуемого. При этом в графе 6 указывается один из следующих родов занятий (вид деятельности) освидетельствуемого:

водители;	рабочие;
военнослужащие;	студенты;
работники сферы обслуживания;	школьники;
работники сферы искусства;	прочие;
	неработающие.

В графе 7 указывается наименование организации, направляющей биологический объект на исследование.

В графе 8 указывается предварительный диагноз, основанный на результатах медицинского осмотра освидетельствуемого, в случаях, если медицинский осмотр проводился.

Графа 9 заполняется только в случае, если биологическим объектом является моча. Указываются результаты предварительного исследования, проведенного согласно пунктам 4.3 и 4.4 Правил отбора биологических объектов для проведения химико-токсикологических исследований на наличие алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов (приложение N 2). При соответствии результатов предварительных исследований всем предъявляемым к ним требованиям (температура, величина pH, плотность, содержание креатинина) делается запись «соответствуют», при несоответствии результатов даже по одному показателю – «не соответствуют».

Графа 10 заполняется только в случаях, когда биологическим объектом является кровь или моча, объем указывается в миллилитрах.

В графу 11 вносится шестизначный код биологического объекта (штрих-код), который соответствует шестизначному коду (штрих-коду) освидетельствуемого.

Графа 12 заполняется работником Подразделения, когда биологический объект направляется на химико-токсикологическое исследование в ХТЛ.

В графу 13 вносятся дополнительные сведения об освидетельствуемом: сведения о лекарствах или наркотических средствах, принятых освидетельствуемым за последние три дня; другая информация, которую сочтет нужным сообщить о себе освидетельствуемый.

В графе 14 освидетельствуемому предлагается расписаться до указания кода биологического объекта в графе 11.

В графе 15 указывается фамилия и ставится подпись работника Подразделения, производившего отбор биологического объекта.

4. Заполненный Журнал хранится в течение 2-х месяцев в Подразделении, затем в архиве медицинской организации в течение 5 лет после отчетного года, после чего уничтожается.

Приложение N 7
к Приказу
Министерства здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
от 27.01.2006 N 40

Министерство
здравоохранения и
социального развития
Российской Федерации

Медицинская документация
Учетная форма N 452/у-06

(Наименование медицинской
организации)

Направление
на химико-токсикологическое исследование

«___» _____ 200__ г.

N _____

В _____

(Наименование химико-токсикологической лаборатории – ХТЛ)

(Наименование медицинской организации и его структурного
подразделения, выдавшего направление)

(Фамилия, имя, отчество освидетельствуемого полностью, возраст)

Объект исследования и его количество _____

Код биологического объекта _____

Дата и время отбора объекта _____

Условия хранения объектов _____

Биологический объект и его количество и показатели _____

Предварительный клинический диагноз _____

Цель химико-токсикологических исследований _____

(На обнаружение

какого вещества (средства) или группы веществ (средств) требуется

Дополнительные сведения _____

провести исследования)

Дата и время отправки биологических объектов в ХТЛ _____

ФИО врача (фельдшера),
выдавшего направление _____

Приложение N 8
к Приказу
Министерства здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
от 27.01.2006 N 40

ИНСТРУКЦИЯ ПО ЗАПОЛНЕНИЮ УЧЕТНОЙ ФОРМЫ N 452/У-06 «НАПРАВЛЕНИЕ НА ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ»

1. Учетная форма N 452/у-06 «Направление на химико-токсикологические исследования» (далее – Направление) заполняется и выдается структурными подразделениями медицинских организаций, проводящих медицинское освидетельствование на состояние опьянения и (или) диагностику факта употребления алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов (далее – Подразделение) в случаях, когда требуется лабораторное подтверждение или исключение наличия алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов в биологических объектах.

2. На основании Направления ХТЛ проводит химико-токсикологические исследования и выдает Справку о результатах химико-токсикологических исследований (учетная форма N 454/у-06) о наличии или отсутствии алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов в представленном на химико-токсикологические исследования биологическом объекте.

3. В Направлении указывается: дата его заполнения и его номер; наименование медицинской организации и Подразделения, выдавшего Направление; наименование ХТЛ, куда направляется биологический объект; фамилия и инициалы освидетельствуемого (при анонимном обращении – штрих-код); возраст; код биологического объекта (штрих-код), дата и время (часы, минуты) отбора биологического объекта, условия хранения биологического объекта после его отбора, включающие температурный режим хранения; биологический объект (кровь, моча, слюна и пр.), для крови и мочи – объем в мл; физико-химические показатели для мочи; если проводился медицинский осмотр – предварительные результаты осмотра биологического объекта; цель химико-токсикологических исследований: на какое вещество (средство) или группы веществ (средств) требуется провести исследования.

4. Направление на химико-токсикологические исследования заполняется и подписывается работником Подразделения, производившим отбор биологического объекта.

5. Направления хранятся в ХТЛ в течение одного года, после чего уничтожаются.

Приложение N 9
к Приказу
Министерства здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
от 27.01.2006 N 40

Министерство
здравоохранения и
социального развития
Российской Федерации

Медицинская документация
Учетная форма N 451/у-06

(Наименование медицинской
организации)

**Справка о доставке биологических объектов
на химико-токсикологические исследования**

«__» _____ 200__ г.

N _____

(Наименование структурного подразделения, производившего отбор
биологических объектов – Подразделение)

(Наименование химико-токсикологической лаборатории – ХТЛ)

Номера направлений на химико-токсикологические исследования и
даты их выдачи _____

Коды (штрих-коды) биологических объектов _____

Дата и время отправки биологических объектов _____

(Ф.И.О. лица, осуществляющего перевозку биологических объектов)

(Фамилия, инициалы и подпись работника Подразделения)

Дата и время доставки биологических объектов в ХТЛ _____

Результаты наружного осмотра биологических объектов _____

Выявленные несоответствия _____

Заведующий ХТЛ _____

(Подпись)

(Фамилия, инициалы)

Штамп ХТЛ

Приложение N 10
к Приказу
Министерства здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
от 27.01.2006 N 40

**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ЗАПОЛНЕНИЮ УЧЕТНОЙ ФОРМЫ 451/У-06
«СПРАВКА О ДОСТАВКЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ
НА ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ»**

1. Учетная форма N 451/у-06 «Справка о доставке биологических объектов на химико-токсикологические исследования» (далее – Справка) заполняется в структурных подразделениях медицинских организаций, в которых проводится медицинское освидетельствование на состояние опьянения и (или) диагностика факта употребления алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов, и в которых производился отбор биологических объектов (далее – Подразделения).

2. Дата на Справке и ее номер, строки Справки «Наименование структурного подразделения медицинской организации, производившего отбор биологических объектов», «Наименование химико-токсикологической лаборатории», «Номера направлений на химико-токсикологические исследования и даты их выдачи», «Коды (штрих-коды) биологических объектов», «Дата и время отправки биологических объектов», «Фамилия и инициалы лица, осуществляющего перевозку биологических объектов» заполняются и подписываются сотрудником Подразделения, работающим в день отправки биологического объекта в ХТЛ.

3. Справка выдается лицу, осуществляющему доставку биологических объектов в ХТЛ, с направлениями на химико-токсикологические исследования (учетная форма N 452/у-06).

4. Доставленные в ХТЛ биологические объекты осматриваются заведующим ХТЛ, которым указывается в Справке дата и время доставки биологических объектов в ХТЛ, проводится наружный осмотр целостности упаковки, проверка соответствия записей на этикетках и количества доставленных биологических объектов сопроводительной документации. Результаты осмотра заносятся заведующим ХТЛ в строку «Результаты наружного осмотра биологических объектов» Справки.

5. В случае несоответствия упаковки требованиям, изложенным в приложении N 2, при неправильном оформлении сопроводительной документации выявленные несоответствия подробно описываются в строке Справки «Выявленные несоответствия».

6. При несоблюдении условий хранения биологических объектов после отбора и при их транспортировке биологические объекты на химико-токсикологические исследования не принимаются с соответствующей записью в строке Справки «Выявленные несоответствия».

7. Справка составляется в двух экземплярах, первый экземпляр остается в ХТЛ, второй заверяется штампом ХТЛ и возвращается в структурное подразделение медицинской организации, в котором был произведен отбор биологических объектов. Оба экземпляра Справки хранятся в течение одного года, после чего уничтожаются.

Приложение N 11
к Приказу
Министерства здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
от 27.01.2006 N 40

Министерство
здравоохранения и
социального развития
Российской Федерации

Медицинская документация
Учетная форма N 454/у-06

(Наименование медицинской
организации)

**Справка о результатах
химико-токсикологических исследований**

(Наименование химико-токсикологической лаборатории – ХТЛ)

Химико-токсикологические исследования N N _____

Дата проведенных химико-токсикологических исследований _____

Химико-токсикологические исследования проведены _____

(Фамилия, инициалы

специалиста ХТЛ, проводившего исследования)

Химико-токсикологические исследования проведены по Направлению на
химико-токсикологическое исследование _____

(Наименование структурного

подразделения медицинской организации, производившего отбор
биологического объекта и выдавшего направление на
химико-токсикологические исследования)

N _____ от «__» _____ 200__ г.

Фамилия, инициалы освидетельствуемого, возраст _____

Код биологического объекта _____

Биологический объект _____

Методы исследования:

предварительные: _____

подтверждающие: _____

При химико-токсикологических исследованиях обнаружены (вещества,
средства): _____

Концентрация обнаруженного вещества (средства) _____

(Подпись специалиста ХТЛ, проводившего исследования)

М.П.

Приложение N 12
к Приказу
Министерства здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
от 27.01.2006 N 40

ИНСТРУКЦИЯ ПО ЗАПОЛНЕНИЮ УЧЕТНОЙ ФОРМЫ N 454/У-06 «СПРАВКА О РЕЗУЛЬТАТАХ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ»

1. Учетная форма N 454/у-06 «Справка о результатах химико-токсикологических исследований» (далее – Учетная форма N 454/у-06) заполняется специалистом ХТЛ, проводившим химико-токсикологические исследования.

2. При заполнении Учетной формы N 454/у-06 указываются: наименование химико-токсикологической лаборатории; номера химико-токсикологических исследований, соответствующие порядковым номерам исследований, зарегистрированных в Журнале регистрации результатов химико-токсикологических исследований (учетная форма N 453/у-06); дата их проведения, фамилия и инициалы специалиста ХТЛ, проводившего химико-токсикологические исследования; номер направления на химико-токсикологические исследования с датой его выдачи и наименованием структурного подразделения медицинской организации, производившего отбор биологического объекта и выдавшего направление; фамилия и инициалы освидетельствуемого и его возраст; шестизначный код биологического объекта освидетельствуемого или штрих-код.

3. В строке «Методы исследования» указываются использованные предварительные методы (иммунохроматографический, иммуноферментный, поляризационный флуороиммуноанализ, тонкослойная хроматография) и подтверждающие методы (спектральные, хроматографические: специализированные системы для обнаружения опиатов, каннабиноидов, бензодиазепинов на основе тонкослойной хроматографии, газожидкостная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, хроматомасс-спектрометрия). Не допускается указание названий методов в сокращениях.

4. В строке «биологический объект» указывается: кровь, моча, слюна и др.

5. В строке «При химико-токсикологических исследованиях обнаружены (вещества, средства)» при обнаружении алкоголя, его суррогатов, наркотических средств (групп средств), психотропных и других токсических веществ (групп веществ) и их метаболитов указывается наименование обнаруженных веществ (средств) в соответствии с принятыми классификациями и в строке «Концентрация обнаруженного вещества (средства)» – массовая концентрация обнаруженного вещества (средства) в биологическом объекте, выраженная в единицах измерения: мкг на мл, мкг на грамм, мг на мл и т.д.

6. Если искомые вещества не обнаружены, в строке «При химико-токсикологических исследованиях обнаружены (вещества, средства)» делается запись (ставится штамп): «указанные в направлении как цель исследования вещества (средства) не обнаружены на уровне предела обнаружения используемого метода».

7. При положительных результатах химико-токсикологических исследований предварительными методами проводится их подтверждение одним или двумя подтверждающими методами. При отрицательных результатах подтверждающих методов в строке «При химико-токсикологических исследованиях обнаружены (вещества, средства)» делается запись (ставится штамп): «указанные в направлении как цель исследования вещества (средства) не обнаружены на уровне предела обнаружения используемого метода».

8. При положительных результатах подтверждающих методов в строке «При химико-токсикологических исследованиях обнаружены (вещества, средства)» делается запись: указанные в направлении как цель исследования вещества (средства) обнаружены на уровне предела обнаружения используемых методов, а при необходимости в строке «Концентрация обнаруженного вещества (средства)» указывается и их концентрация.

9. Заполненная учетная форма N 454/у-06 подписывается специалистом ХТЛ, проводившим химико-токсикологические исследования, и заверяется печатью наркологического диспансера (наркологической больницы), в структуре которого находится ХТЛ, или штампом ХТЛ с указанием полного наименования наркологического диспансера (наркологической больницы) и хранится в архиве наркологического диспансера (наркологической больницы) в течение 5 лет, после чего уничтожается.

Министерство
здравоохранения и
социального развития
Российской Федерации

(Наименование медицинской
организации)

результат

Исследования	Код биологического объекта
1	2

Использованные методы

предварительные

Приложение N 13
к Приказу
Министерства здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
от 27.01.2006 N 40

Министерство
здравоохранения и
социального развития
Российской Федерации

Медицинская документация
Учетная форма N 453/у-06

(Наименование медицинской
организации)

**Журнал регистрации
результатов химико-токсикологических исследований**

№ исследования	Код биологического объекта	Фамилия, инициалы освидетельствуемого, возраст	Дата и время получения ХТЛ биологического объекта	Наименование структурного подразделения медицинской организации, производившего отбор биологического объекта	Биологический объект, его количество
1	2	3	4	5	6

Использованные методы исследования		Результаты химико-токсикологических исследований	Подпись специалиста ХТЛ, проводившего химико-токсикологические исследования	Подпись и фамилия лица, получившего Справку о результатах химико-токсикологических исследований
предварительные	подтверждающие			
7	8	9	10	11

Приложение N 14
к Приказу
Министерства здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
от 27.01.2006 N 40

ИНСТРУКЦИЯ ПО ЗАПОЛНЕНИЮ УЧЕТНОЙ ФОРМЫ N 453/У-06 «ЖУРНАЛ РЕГИСТРАЦИИ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ»

1. Учетная форма N 453/у-06 «Журнал регистрации результатов химико-токсикологических исследований» хранится в ХТЛ.

В Журнале регистрации результатов химико-токсикологических исследований регистрируются все Направления на химико-токсикологические исследования (учетная форма N 452/у-06) биологических объектов, поступивших в ХТЛ на химико-токсикологические исследования.

2. Графы 1 – 6 заполняются заведующим ХТЛ, принявшим Направление на химико-токсикологическое исследование и биологический объект:

в графе 1 указывается порядковый номер химико-токсикологического исследования;

в графе 2 указывается код (штрих-код) исследуемого биологического объекта;

сведения, содержащиеся в графах 3, 4, 5 и 6, соответствуют сведениям Направления на химико-токсикологические исследования (учетная форма N 452/у-06).

3. Графы 7 – 10 заполняются специалистом ХТЛ, проводившим химико-токсикологические исследования.

Сведения, содержащиеся в графах 7, 8 и 9, соответствуют сведениям, содержащимся в Справке о результатах химико-токсикологических исследований (учетная форма N 454/у-06).

4. Нумерация исследований в графе 1 начинается с 1 января каждого календарного года с порядкового номера 1.

5. Заполненный Журнал регистрации результатов химико-токсикологических исследований хранится в течение 2-х месяцев в ХТЛ, затем в архиве наркологического диспансера (наркологической больницы), в структуре которого организована ХТЛ, в течение 5 лет, после чего уничтожается.

Приложение N 15
к Приказу
Министерства здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
от 27.01.2006 N 40

Отчет о работе химико-токсикологической лаборатории
наркологического диспансера (наркологической больницы)

Представляют	Сроки представления
Химико-токсикологические лаборатории наркологических диспансеров (наркологических больниц):	
- органу управления здравоохранением республики (края, области, автономного округа)	В установленные им сроки
- Центральной химико-токсикологической лаборатории при кафедре аналитической и судебно-медицинской токсикологии факультета последипломного профессионального образования провизоров ГОУ ВПО Московской медицинской академии имени И.М. Сеченова Росздрава	20 января следующего после отчетного года

Отчетная
форма N 59
Утверждена
Приказом
Министерства
здравоохранения и
социального
развития
от 27.01.2006 N 40

Годовая

Формы по ОКУД	Отчитывающаяся организация по ОКПО	Территории по ОКАТО

Коды проставляет отчитывающаяся организация

	Освидетельствуемые			
	дети		взрослые (18 лет и старше)	всего
	0 – 14 лет включительно	15 – 17 лет включительно		
1	2	3	4	5
Число освидетельствованных – всего				
в т.ч. на алкоголь				
на наркотические средства и психо- тропные вещества				
Число освидетельствованных, у которых подтверждено наличие психоактивных веществ, – всего				
в т.ч. алкоголя				

наркотических средств и психотропных веществ:				
опиаты				
каннабиноиды				
амфетамины				
кокаин				
барбитураты I и II списка				
метадон				
фенциклидин				
другие наркотические средства				
психотропные вещества				
комбинации наркотических средств и психотропных веществ				
Из общего числа освидетельствованных направлено:				
– органами внутренних дел				
– медицинскими организациями				
– по личным заявлениям				

Заведующий ХТЛ

(Подпись)

(Фамилия, инициалы)

Контактный телефон, адрес электронной почты

Главный врач наркологического диспансера (наркологической больницы)

(Подпись)

(Фамилия, инициалы)

«—» _____ 200 г.

ПО 3
ХИМИКО

1. Отчетна
ческого диспа
Журнала рег
N 453/у-06).

2. Отчет с
главным вра
рого организ

3. Сведен
женных пси
указываются
ваний (учет

4. Первы
нием по под
логической
культета по
медицинско
года, третий
лет, после ч

Приложение N 16
к Приказу
Министерства здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
от 27.01.2006 N 40

**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ЗАПОЛНЕНИЮ ОТЧЕТНОЙ ФОРМЫ N 59 «ОТЧЕТ О РАБОТЕ
ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ НАРКОЛОГИЧЕСКОГО
ДИСПАНСЕРА (НАРКОЛОГИЧЕСКОЙ БОЛЬНИЦЫ)»**

1. Отчетная форма N 59 «Отчет о работе химико-токсикологической лаборатории наркологического диспансера (наркологической больницы)» заполняется заведующим ХТЛ на основании Журнала регистрации результатов химико-токсикологических исследований (учетная форма N 453/у-06).

2. Отчет составляется в 3-х экземплярах за отчетный год, подписывается заведующим ХТЛ и главным врачом наркологического диспансера (наркологической больницы), в структуре которого организована ХТЛ, и заверяется печатью диспансера (больницы).

3. Сведения по каждой строке разделяются по возрасту обследуемых; наименования обнаруженных психоактивных веществ (алкоголя, наркотических средств и психотропных веществ) указываются из графы 9 Журнала регистрации результатов химико-токсикологических исследований (учетная форма N 453/у-06).

4. Первый экземпляр отчета направляется вышестоящему органу управления здравоохранением по подчиненности в установленные сроки, второй – в адрес Центральной химико-токсикологической лаборатории при кафедре аналитической и судебно-медицинской токсикологии факультета последипломного профессионального образования провизоров ГОУ ВПО Московской медицинской академии имени И.М. Сеченова Росздрава до 20 января следующего за отчетным года, третий экземпляр отчета хранится в ХТЛ. Все экземпляры отчетов хранятся в течение пяти лет, после чего уничтожаются.

МЕТОД
ОПРЕ
АНАЛО
КОКА
У

Приложение 2

**МЕТОДИКА ОБНАРУЖЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПИАТОВ И ИХ СИНТЕТИЧЕСКИХ
АНАЛОГОВ, ПРОИЗВОДНЫХ ФЕНИЛАЛКИЛАМИНОВ,
КОКАИНА, КЕТАМИНА В МОЧЕ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ МАСС-СЕЛЕКТИВНЫМ
ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ**

1. Область применения

Настоящая методика устанавливает хроматографический метод с масс-селективным детектированием обнаружения и количественного определения опиатов и их синтетических аналогов, производных фенилалкиламинов, кокаина, кетамина в биологических объектах (моча). При использовании метода хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МСД) диапазон измеряемых концентраций составляет в режиме полного сканирования (TIC) 0.05 – 1000 мкг/мл, в режиме селективного мониторинга выбранных ионов (SIM) 0.005 – 1000 мкг/мл.

2. Нормативные ссылки

1. С.К. Еремин, Б.Н. Изотов, Н.В. Веселовская Анализ наркотических средств, М., «Мысль», 1993, 260 с.
2. Е.А. Симонов, Б.Н. Изотов, А.В. Фесенко Наркотики. Методы анализа на коже, ее придатках и выделениях, ММА им. Сеченова, М., 2000 г., 128 с.

ГОСТ Р 8.563-96	Методики выполнения измерений
ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ	Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны
ГОСТ 12.1.019-79 ССБТ	Электробезопасность. Общие требования к номенклатуре видов защиты
ГОСТ	Гелий. Технические условия
ГОСТ 6709-72	Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 9293-74	Азот газообразный и жидкий. Технические условия
ГОСТ 17433-80	Промышленная чистота. Сжатый воздух. Классы загрязненности
ГОСТ 24104-88	Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия
ГОСТ 25336-82	Посуда и оборудование лабораторные, стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 28498-90	Термометры жидкостные, стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний
ГОСТ 29227-91	Посуда лабораторная, стеклянная. Пипетки градуированные Часть 1. Общие требования

3. Метод анализа

3.1 Сущность метода

Метод основан на выделении определяемых наркотических веществ из мочи методами жидкостной или твердофазной экстракции, последующим концентрированием экстракта упариванием, обработкой его трифторуксусным ангидридом и определением полученных трифторацетильных (ТФА) производных методом хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МСД). Идентификацию (обнаружение) наркотических веществ в методе ГХ-МСД выполняют по стандартным библиотекам масс-спектров Pflieger и NIST, для количественного анализа наркотических веществ применяют градуировочные смеси, которые изготавливают по п.4.2.2.

3.2 Аппаратура, материалы и реактивы

– Хромато-масс-спектрометр «TraceMS» в комплектации, производства фирмы «Thermo MASSLAB LIMITED» (Великобритания).

Допускается применение аппаратуры аналогичной по характеристикам.

- Газ-носитель – гелий, сжатый в баллоне по ГОСТ
- Вода дистиллированная по ГОСТ 6709
- Хлороформ, ч.д.а.

- Изопропанол,
- Ацетонитрил
- Патроны для
- Трифторуксус
- Метанол для
- Дифениламин
- Хлорид натрия
- p-Глюкурони
- Лимонная ки
- Натрий лим
- Гидрокарбон
- Автоматиче
- Микрошпр
- Пробирка с
- Виалы (сос
объемом 2 мл Ag
- Виалы (сос
объемом 10 мл
- Химическа
- Весы анали
- Центрифуг
- Штатив дл
предохранител
ный вакуум (20
Допускается
тиками не ниже
4. Подготовка
4.1. Пригот
Раствор А
10,5 г лимон
до метки. Пол
Раствор В
14,71 г ци
дой до метки
35 мл раство
4.2. Пригот
4.2.1. При
Пригото
вносят 200 м
в растворе А
Пригото
мерной пип
ДФА в раст
4.2.2. При
Пригото
вносят 100
дартного в

- Изопропанол, ч.д.а.
- Ацетонитрил для ВЭЖХ, ч.д.а.
- Патроны для твердофазной экстракции Evidex, J&W
- Трифторуксусный ангидрид для хроматографии Merck cat. № 125513
- Метанол для хроматографии ТУ 6-09-1709-77
- Дифениламин, ч.д.а.
- Хлорид натрия, ч.д.а.
- р-Глюкуронидаза, Sigma HP-2, cat. № G 7017
- Лимонная кислота х.ч., ГОСТ3652-69
- Натрий лимоннокислый, двухводный, ч., ТУ2499-002-0034237-98
- Гидрокарбонат натрия х.ч.
- Автоматические пипетки объемом 200 – 1000 мкл
- Микрошприцы хроматографические на 10 мкл Hamilton
- Пробирка с притертой пробкой объемом 15 мл
- Виалы (сосуды) стеклянные с завинчивающейся пробкой и тефлонированной мембраной объемом 2 мл Agilent Technologies
- Виалы (сосуды) стеклянные с завинчивающейся пробкой и тефлонированной мембраной объемом 10 мл (Agilent Technologies)
- Химическая посуда общего назначения
- Весы аналитические ВЛР-200
- Центрифуга лабораторная, 10000 об/мин
- Штатив для патронов (картриджей) для твердофазной экстракции с регулятором вакуума, предохранительным клапаном с вакуумным мембранным насосом, обеспечивающий безмасляный вакуум (20 мм рт. ст.)

Допускается использовать оборудование, материалы и реактивы с техническими характеристиками не ниже указанных.

4. Подготовка к анализу

4.1. Приготовление буферного раствора pH 5.0

Раствор А (0.1 молярный раствор лимонной кислоты)

10,5 г лимонной кислоты вносят в мерную колбу на 500 мл и доводят дистиллированную воду до метки. Полученный раствор содержит 21,01 г/л лимонной кислоты.

Раствор В (дигидрат тринатриевой соли цитрата натрия 0.1 моль)

14,71 г цитрата натрия вносят в мерную колбу на 500 мл и доводят дистиллированной водой до метки. Для приготовления буферного раствора pH 5.0 в мерную колбу на 100 мл вносят 35 мл раствора А и доливают раствор В до метки.

4.2. Приготовление стандартных растворов

4.2.1. Приготовление раствора внутреннего стандарта дифениламина

Приготовление раствора А. В мерную пробирку с притертой пробкой вместимостью 15 мл вносят 200 мг дифениламина (ДФА) и доводят ацетонитрил до метки 10 мл. Концентрация ДФА в растворе А составляет 20 мг/мл

Приготовление раствора Б. В мерный цилиндр с притертой пробкой вместимостью 100 мл мерной пипеткой вносят 1 мл раствора А и доводят ацетонитрил до метки 100 мл. Концентрация ДФА в растворе Б составляет 200 мкг/мл.

4.2.2. Приготовление градуировочных растворов (смесей)

Приготовление раствора А. В мерную пробирку с притертой пробкой вместимостью 15 мл вносят 100 мг наркотического вещества и доводят метанол до метки 10 мл. Концентрация стандартного вещества в растворе А составляет 10 мг/мл.

Приготовление раствора Б. В мерный цилиндр с притертой пробкой объемом 100 мл мерной пипеткой вносят 1 мл раствора А и доводят ацетонитрил до метки 100 мл. Концентрация наркотического вещества в растворе Б составляет 100 мкг/мл.

По методике 4.2.2. готовят градуировочные смеси морфина, кодеина, 6-моноацетилморфина, трамадола, промедола, кетамина, кокаина, амфетамина, метамфетамина

5. Хромато-масс-спектрометрическое обнаружение в волосах и ногтях, а также в биожидкостях

5.1 Исследование волос и ногтей

Методика пробоподготовки объектов: для удаления внешних загрязнений волосы и ногти отмывали 2 N раствором хлороводородной кислоты и метанолом до полного исчезновения в «смывах», после их упаривания, следов наркотических средств. Затем навеску образцов 40 мкг мелко измельчали ножницами, заливали 1 мл метанола и обрабатывали ультразвуком не менее 1 часа. После этого жидкость сливали. Образцы промывали 1 мл метанола и объединенные метанольные экстракты упаривали досуха.

Хромато-масс-спектрометрическое исследование экстрактов проводили, используя усовершенствованный метод повышенной производительности: упаренную досуха аликвоту обрабатывали 50 мкл ТФА (трифторуксусного ангидрида) при 60° С без доступа воздуха в течение 20 минут. После охлаждения остатки реактива упаривали в токе азота и затем растворяли в 100 мкл хлороформа. Исследования проводили на газовом хроматографе с масс-селективным детектором, оснащенном кварцевой капиллярной колонкой длиной 25 м, диаметром 0,2 мм и фенил-(5%)-метилсиликоном в качестве неподвижной фазы. С момента ввода образца давление на входе колонки (в течение 1 мин) составляло 3 кг/см², далее в процессе анализа оно поддерживалось автоматически для обеспечения постоянного расхода гелия, равного 2 мл/мин. Температура колонки программировалась от 100° С до 310° С со скоростью 35° С/мин. Общее время анализа составило 13 мин. Температуры испарителя, детектора и интерфейса составляли 280° С. Масс-селективный детектор работал в режимах сканирования от 50 до 550 m/z и регистрации характеристических ионов морфина 2 ТФА: 477, 364 и 380 m/z. Идентификацию веществ проводили по молекулярным и характеристическим ионам, а также с помощью автоматического поиска с использованием библиотек масс-спектров, предоставленных фирмой-производителем оборудования.

5.2. Исследование биожидкостей

Ферментативный гидролиз. В виалу (сосуд), содержащую 2 мл пробы, автоматической пипеткой вносят 200 мкл желудочного сока виноградной улитки *Helix Pomatia*, содержащего β-глюкуронидазу, активность 1,00000 ед./мл. Сульфатазная активность препарата должна составлять не менее 5,000 ед./мл. К пробе добавляют 1 мл цитратного буферного раствора с рН 5,0, закрывают сосуд завинчивающейся пробкой и выдерживают при температуре 50° С в течение 30 мин. Допускается проводить гидролиз в течение 12 часов при температуре 37° С. После проведения гидролиза пробу подвергают жидкостной или твердофазной (ТФА) экстракции.

Выделение определяемых веществ жидкостной экстракцией. После проведения ферментативного гидролиза пробу центрифугируют 2 мин при 10 тыс. об/мин, отделяют надосадочный слой пипеткой и переносят его в пробирку с притертой пробкой вместимостью 15 мл, добавляют 1 мл насыщенного раствора гидрокарбоната натрия (в дистиллированной воде), экстрагируют 5 мл смеси хлороформ-изопропанол (9:1) в течение 3-х минут, пипеткой отделяют органический слой, центрифугируют органическую фракцию 2 мин при 10 тыс. об./мин, отбирают надосадочный слой пипеткой и сушат добавлением 0,3 – 1 г безводного хлорида натрия. Предварительно хлорид натрия промывают в хлороформе для удаления органических загрязнений. Полученный экстракт переносят в коническую стеклянную колбу с притертым шлифом вместимостью 20 мл и упаривают экстракт на роторном испарителе до объема 1 мл, после чего экстракт пе-

переносят в стеклянный сосуд объемом 2 мл с завинчивающейся крышкой и тефлонированной мембраной, упаривают досуха в токе азота и подвергают переводу в производные.

Выделение определяемых веществ твердофазной экстракцией. Патрон для твердофазной экстракции перед экстракцией устанавливают в штатив и промывают 3 мл метанола. Одновременно в штатив может быть установлено до 15 патронов Evidex, что повышает экспрессность профподготовки.

Пробу после проведения ферментативного гидролиза центрифугируют 2 мин при 10 тыс. об./мин, отделяют надосадочный слой пипеткой и переносят его в патрон для твердофазной экстракции, пропускают пробу через патрон со скоростью 0,2 мл/мин, промывают патрон 3 мл 15%-ного раствора ацетонитрила в дистиллированной воде для удаления соэкстрактивных компонентов и элюируют определяемые вещества 1 мл метанола. Элюат собирают в стеклянный сосуд объемом 2 мл. Элюат упаривают досуха в токе азота и подвергают переводу в производные.

Проведение реакции перевода в производные (получения трифторацетильных производных). К упаренным экстрактам добавляют 100 мкл трифторуксусного ангидрида, закрывают сосуд завинчивающейся крышкой с тефлонированной мембраной и выдерживают сосуд с пробой при 50° С в течение 30 мин в термостате воздушной сушки. По окончании выдержки испаряют остатки реагента досуха слабым током азота и реконструируют экстракт 100 мкл этилацетата. 1 мкл экстракта вводят в испаритель хроматографа.

6. Проведение хроматографического анализа

Хроматографическую систему включают и настраивают в соответствии с инструкцией по эксплуатации и устанавливают параметры хроматографии и масс-спектрометрического детектирования.

6.1. Условия хроматографического анализа

Температура термостата колонок 70° С, 35° С/мин, 270° С (1 мин), 10° С/мин, 290° С (4 мин). Анализ в режиме постоянного давления газа-носителя (Constant Pressure). В качестве газа носителя используют гелий.

Температура испарителя хроматографа составляет 220° С и аналитического интерфейса (хроматограф/масс-спектрометр) 280° С. Ввод пробы осуществляют в режиме без деления потока (splitless) 10 мин.

Времена удерживания определяемых соединений для колонки HP-5MS 30 м; 0,32 мм; 0,25 мкм или аналогичных ей представлены в табл. 1.

Градуировку приборов для проведения количественного анализа выполняют по методу внутреннего стандарта (трифторацетильное производное дифениламина) согласно инструкции к прибору. Для градуировки используют смеси веществ, приготовленные по п.4.2.2.

6.2. Условия масс-спектрометрического детектирования

6.2.1. Анализ в режиме сканирования по полному ионному току

«Задержка на растворитель» время включения катодов и анализатора – через 3 мин после ввода пробы

Температура источника ионов 220° С

Температура анализатора 150° С

Диапазон масс m/z 41 - 550 а.е.м.

6.2.2. Анализ в режиме мониторинга по выбранным ионам (SIM). Характеристичные ионы для определяемых веществ представлены в табл. 1. В качестве характеристичных могут быть выбраны базовый ион масс-спектра и молекулярный ион определяемого соединения. При отсутствии в масс-спектре интенсивного молекулярного иона в качестве дополнительного к базовому для селективного мониторинга выбирают фрагментарный ион наибольшей интенсивности, который выполняет роль подтверждающего.

Табл. 1. Времена удерживания и характеристические ионы определяемых соединений*

Вещество	RT, мин	Группа	Характеристические ионы m/z, в скобках % от базового пика
Амфетамин ТФА	5,96	1	140(100), 118(90), 91(38)
Метамфетамин ТФА	6,45	1	154(100), 118(30)
Димедрол (ТФА производных не образует)	11,60	2	165(20), 58(100)
6-Моноацетилморфин ТФА	13,60	3	364(100), 423(50)
Кодеин ТФА	13,26	3	282(100), 395(50)
Морфин 2ТФА	13,99	3	364(100), 477(80)
Внутренний стандарт, дифениламин ТФА	9,68	2	265(100), 172(70)

* – Времена удерживания могут меняться в зависимости от условий разделения и используемой колонки.

7. Обработка результатов, показатели точности методики выполнения измерений

Идентификацию определяемых соединений проводят по временам удерживания и масс-спектрам (в методе полного сканирования TIC) и соотношения интенсивностей детектируемых ионов (в методе ионного мониторинга SIM). Выявление хроматографических и масс-спектрометрических наложений проводят по совпадению вершин пиков ионов (базового и подтверждающих).

При анализе методами ГХ-МСД результаты количественного анализа получают путем автоматического расчета по площади базового иона с учетом коэффициента относительной чувствительности (КОЧ) по отношению к трифторацетильному производному дифениламина (BC). Погрешность определения для метода ГХ-МСД не должна превышать 25% и 15% на уровне определяемых концентраций 0,005–0,5 и 0,5–1000 мг/мл, соответственно.

Группы детектируемых ионов в методе SIM

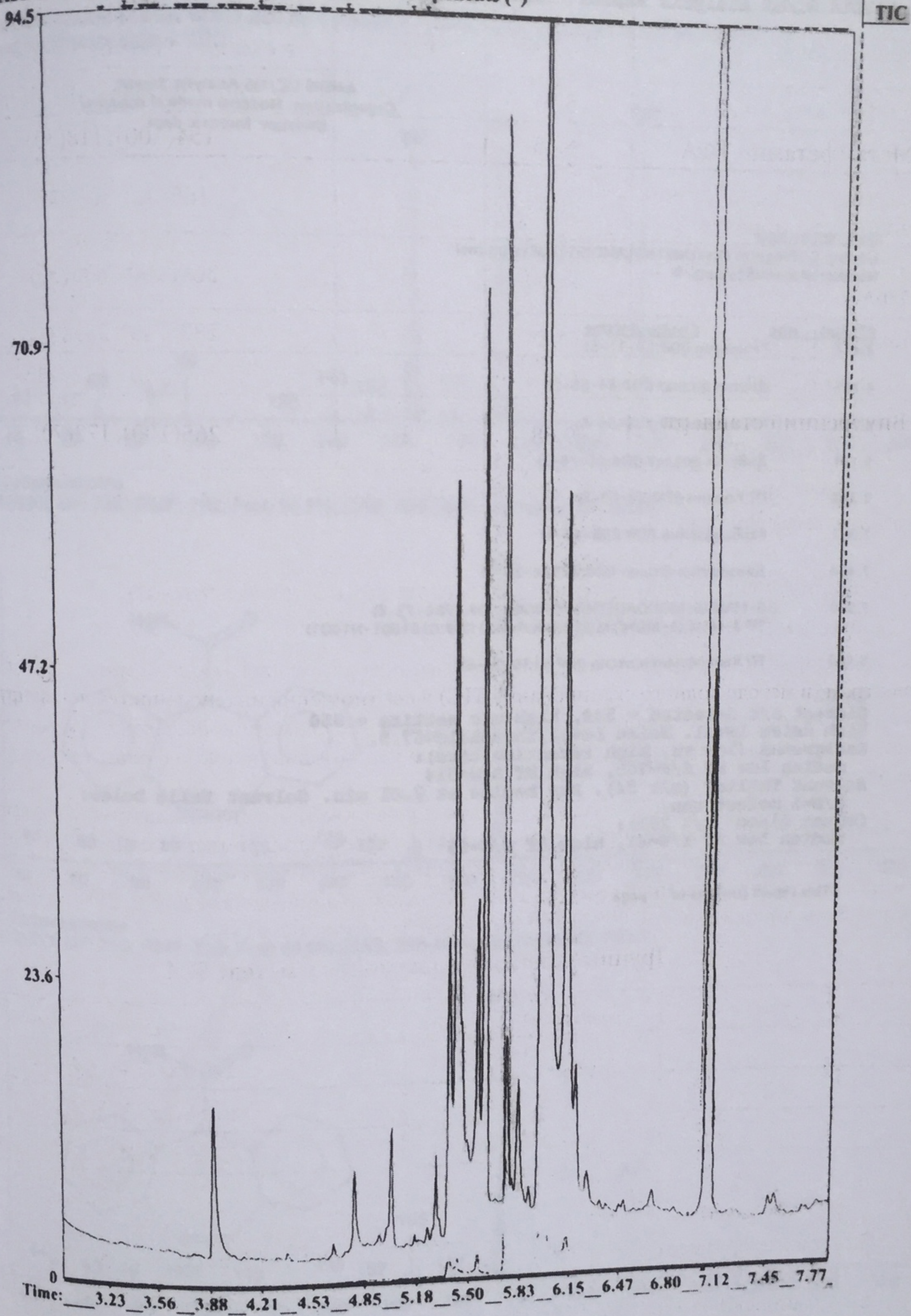
Группы	Диапазон RT, мин	детектируемые ионы, m/z
1	3-8	140,118,154,110
2	8-12.5	165,58,265,172,169
3	12.5-16	282,395,364/23,477

Список литературы

1. С.К. Еремин, Б.Н. Изотов, Н.В. Веселовская. Анализ наркотических средств. М., Мысль, 1993, 260 с
2. Е.А. Симонов, Б.Н. Изотов, А.В. Фесенко. Наркотики. Методы анализа на коже, ее придатках и выделениях. ММА им. И.М. Сеченова, Москва, 2000 г., 128 с.

GC/MS Analysis - Data:D:\DATA\SCL01

Abundance [3.31%][1292290] 9 targets (·), 211 components (·)



Хроматограмма мочи больного, поступившего в клинику с передозировкой карбамазепина

AMDIS GC/MS Analysis Report - Data:D:\DATA\SCL01.FID

AMDIS GC/MS Analysis Report
Organization: Moscow medical academy
Division: forensic dept

Data: SCL01.RAW
Library: C:\Program Files\NISTMS\AMDIS32\LIB\crim.msl
Number of identifications: 9

RT(min)	Hits	Chemical Name
3.457	?	Никотин (ID#:54-11-5)
4.265		Диэтил фталат (ID#:84-66-2)
4.783	?	Котинин (ID#:486-56-6)
5.161		Дибутил фталат (ID#:84-74-2)
5.248	???	Кофеин (ID#:58-08-2)
7.081		Карбамазепин (ID#:298-46-4)
7.464		Дизооктил фталат (ID#:27554-26-3)
7.964	2	6-МAM (6-МОНОАЦЕТИЛМОРФИН) (ID#:2784-73-8) ??? 3-МAM (3-МОНОАЦЕТИЛМОРФИН) (ID#:0101001-N1001)
8.785	???	Кариофиллен оксид (ID#:1139-30-6)

QA/QC:

Highest m/z detected = 549, high m/z setting = 550

High noise level. Noise Level/Threshold=57.8.

Background (low vs. high retention time):

median low RT S/N=705, high RT S/N=514

Solvent Tailing (m/z 84). Run begins at 2.01 min. Solvent falls below:
S/N=1 before run

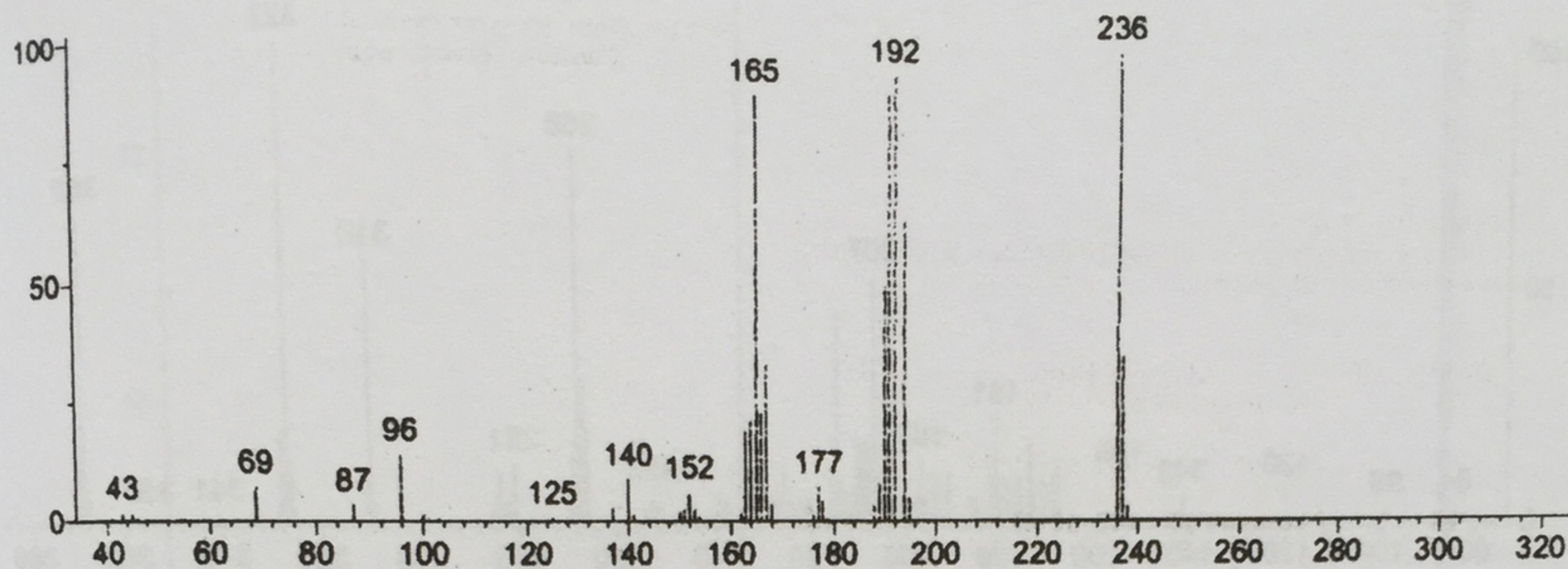
Column Bleed (m/z 207):

median low RT S/N=41, high RT S/N=65

This report consists of 1 page

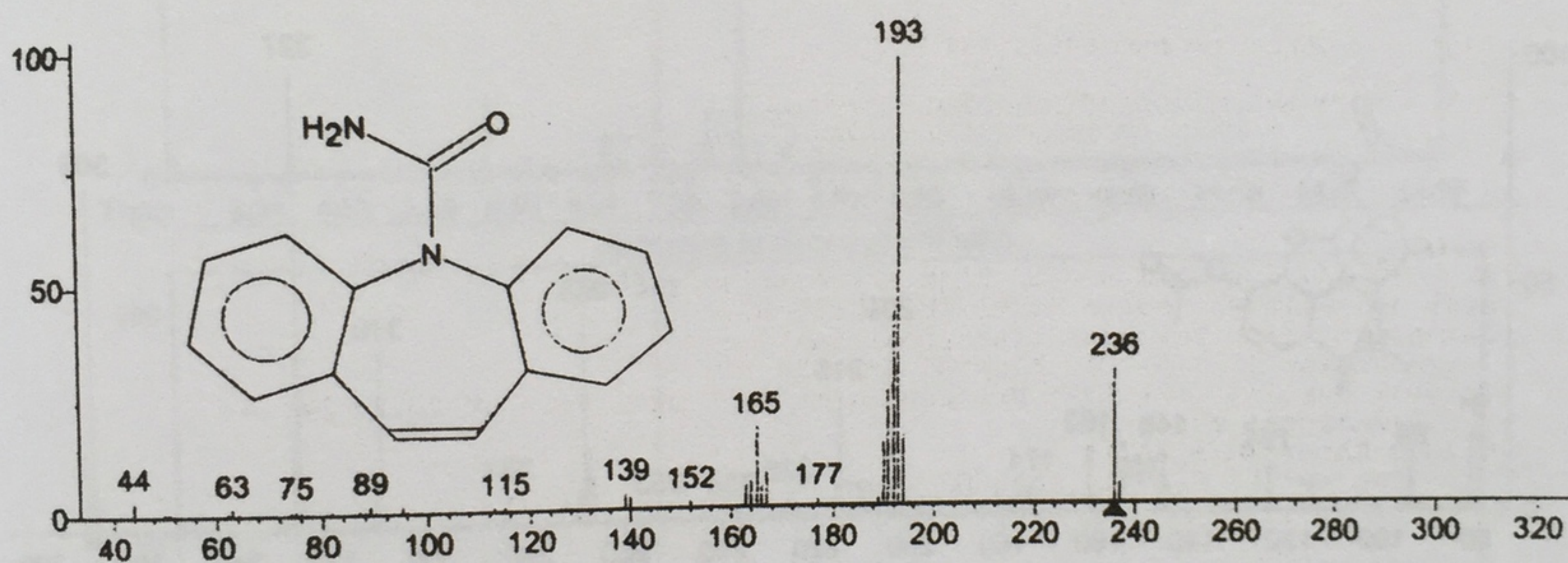
** Search Report Page 1 of 1 **

Unknown: Component at scan 643 (7.081 min) [Model = +236u, -82u] in D:\DATA\SCL01.RAW
Compound in Library Factor = -273



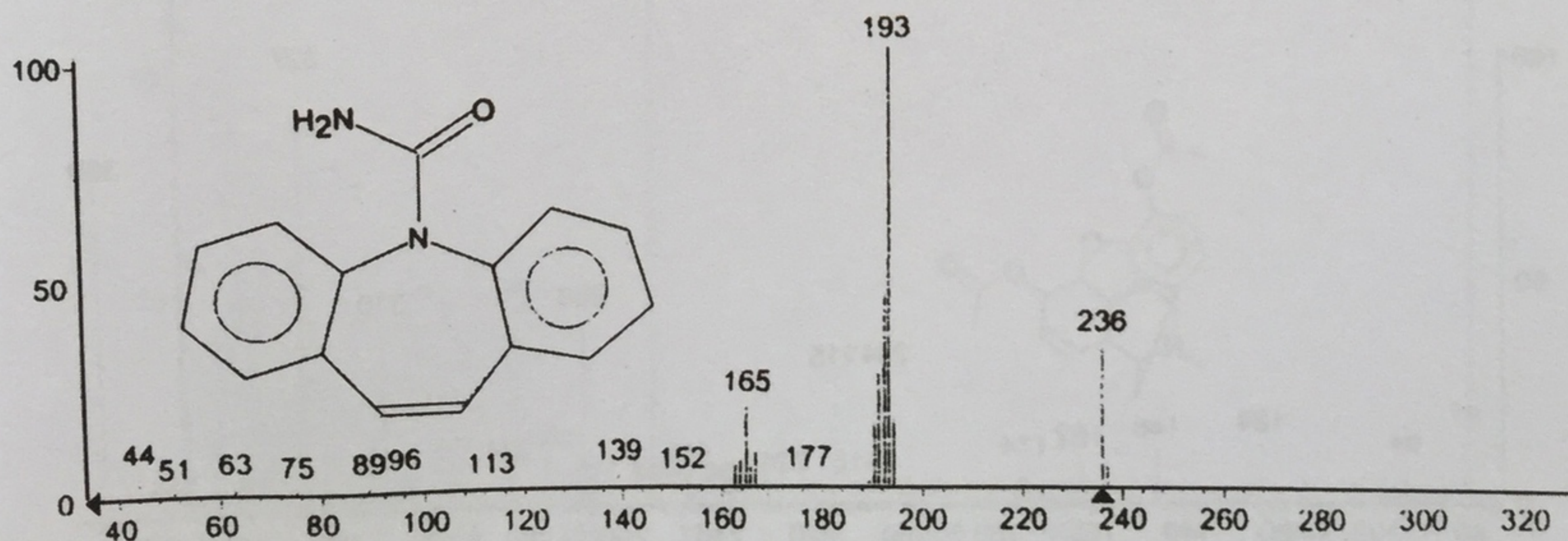
Hit 1: Carbamazepine

C₁₅H₁₂N₂O; MF: 728; RMF: 730; Prob 84.9%; CAS: 298-46-4; Lib: replib; ID: 18021.

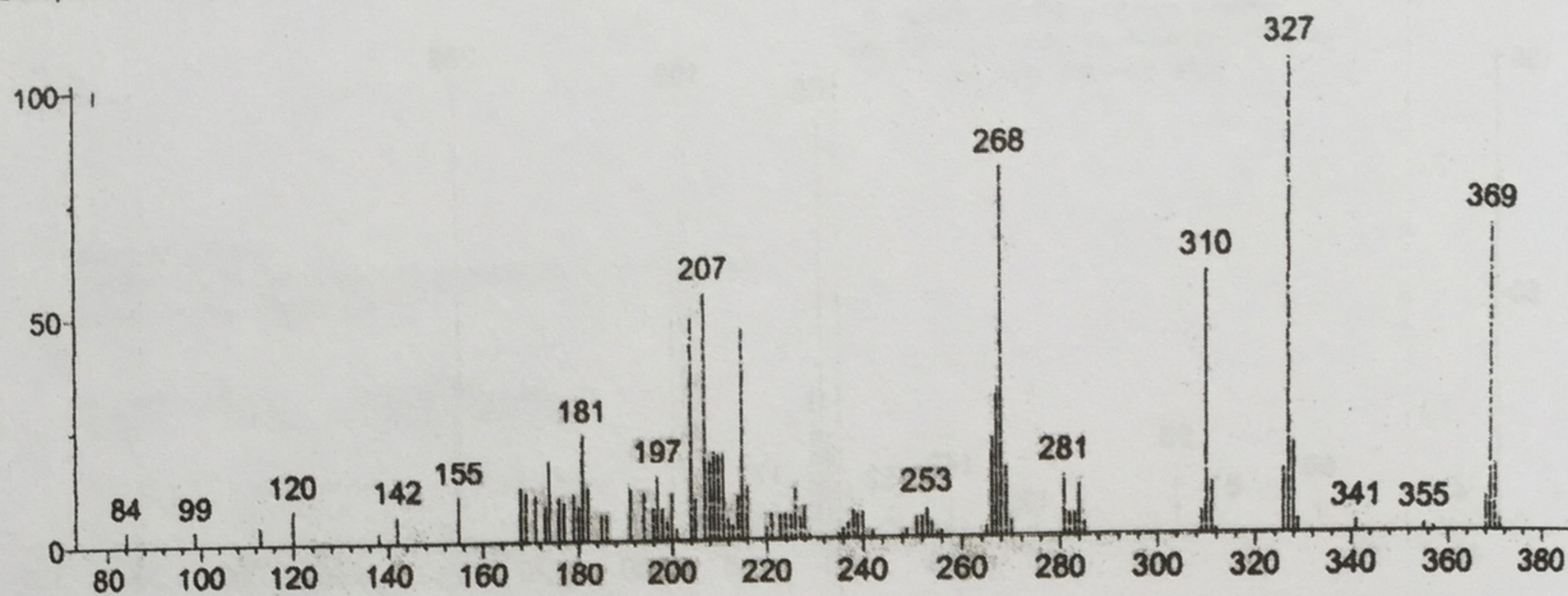


Hit 2: Carbamazepine

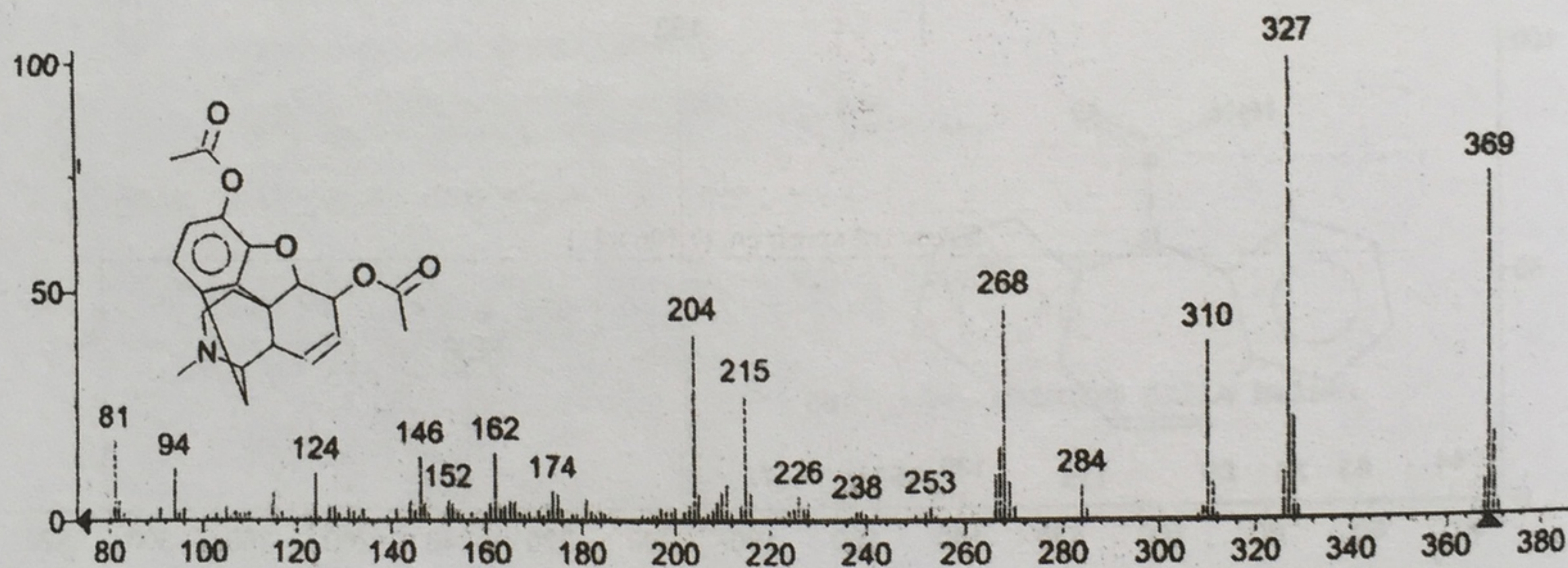
C₁₅H₁₂N₂O; MF: 713; RMF: 715; Prob 84.9%; CAS: 298-46-4; Lib: replib; ID: 18022.



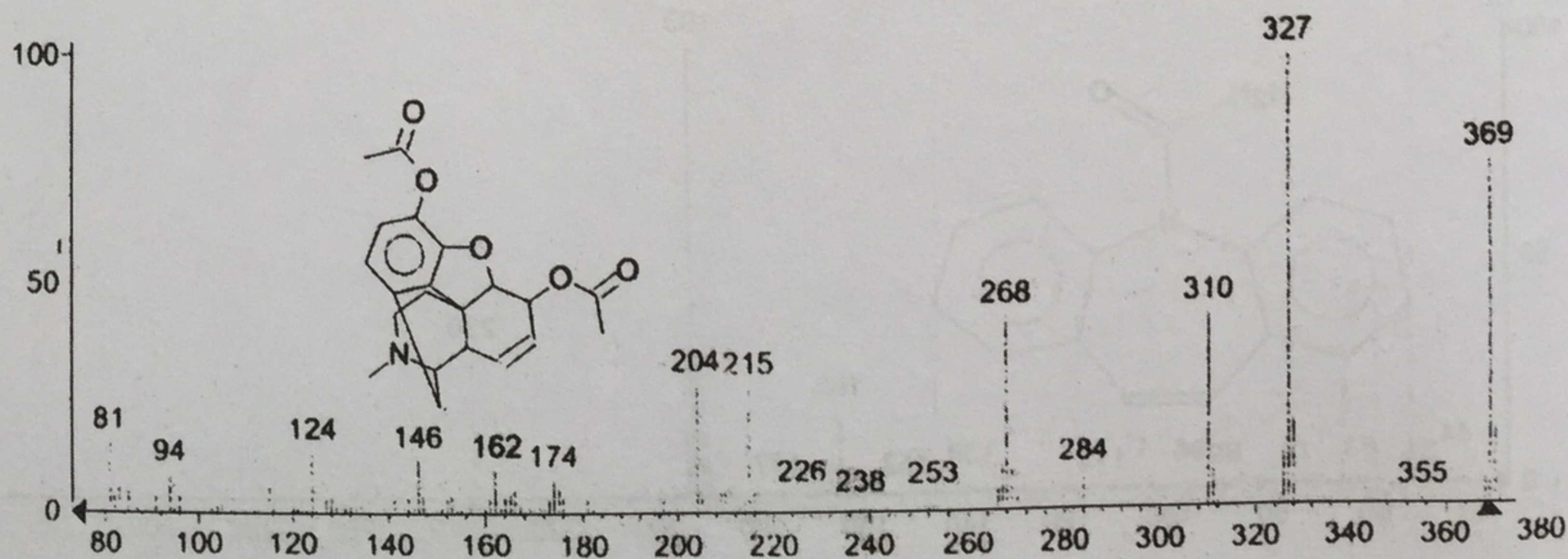
Unknown: Component at scan 755 (8.467 min) [Model = +327u] in D:\DATA\URINE\TST001.RAW
Compound in Library Factor = -118



Hit 1 : Diacetylmorphine
C₂₁H₂₃NO₅; MF: 788; RMF: 790; Prob 92.5%; CAS: 561-27-3; Lib: replib; ID: 20797.



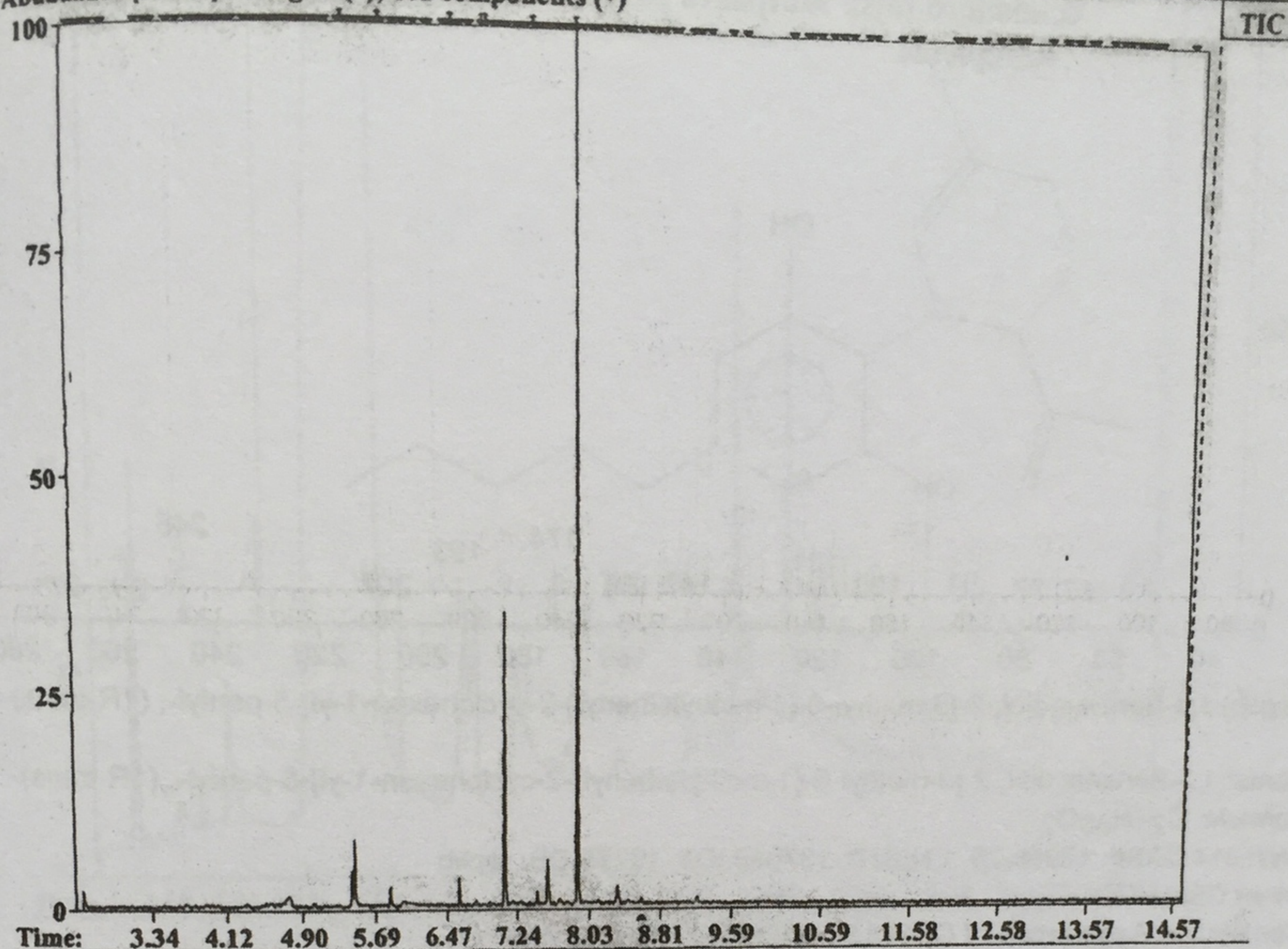
Hit 2 : Diacetylmorphine
C₂₁H₂₃NO₅; MF: 771; RMF: 772; Prob 92.5%; CAS: 561-27-3; Lib: maintlib; ID: 101799.



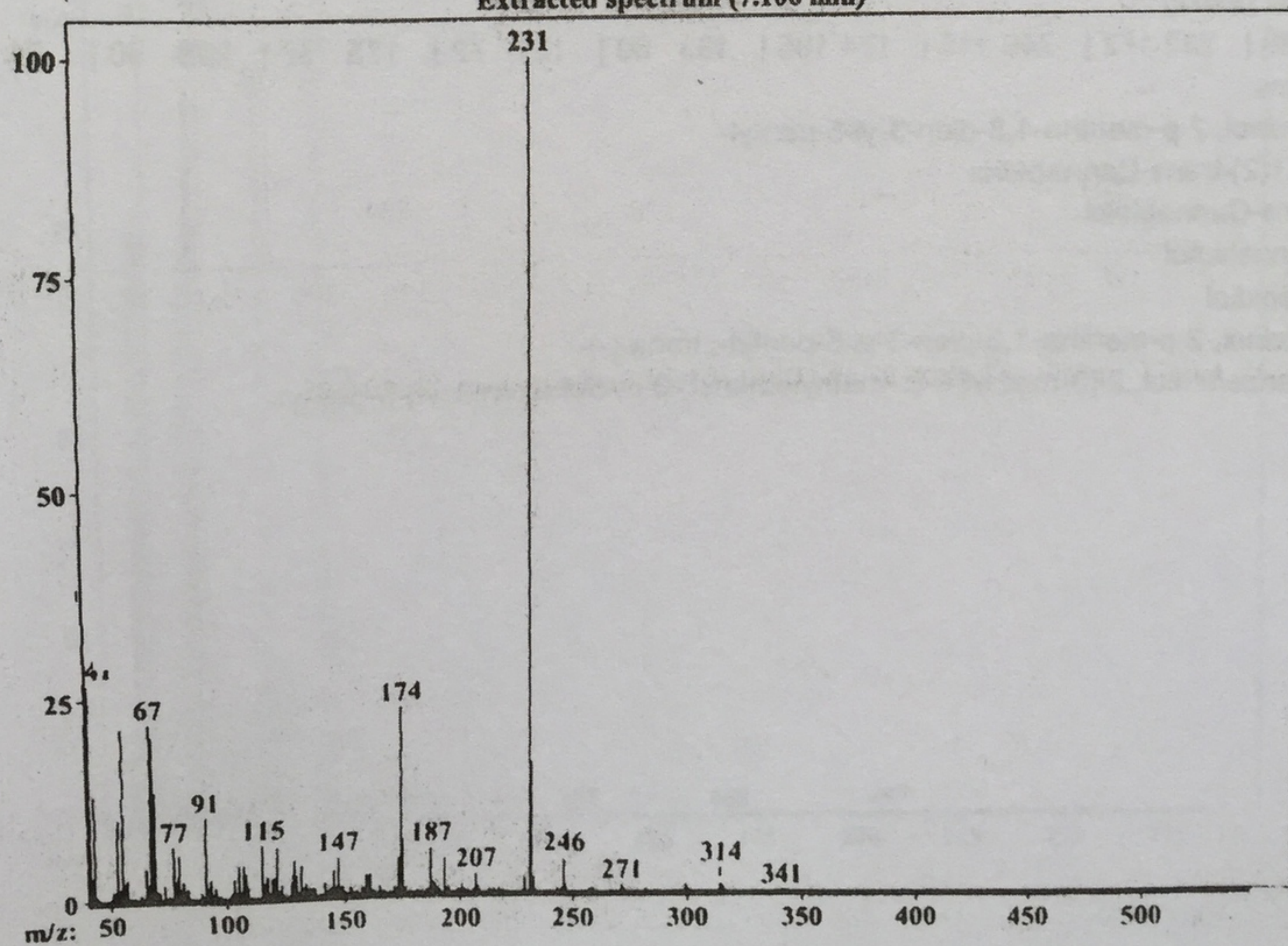
Выявление героина в биопробе

GC/MS Analysis - Data:D:\DATA\URINE\TST001_011210212357

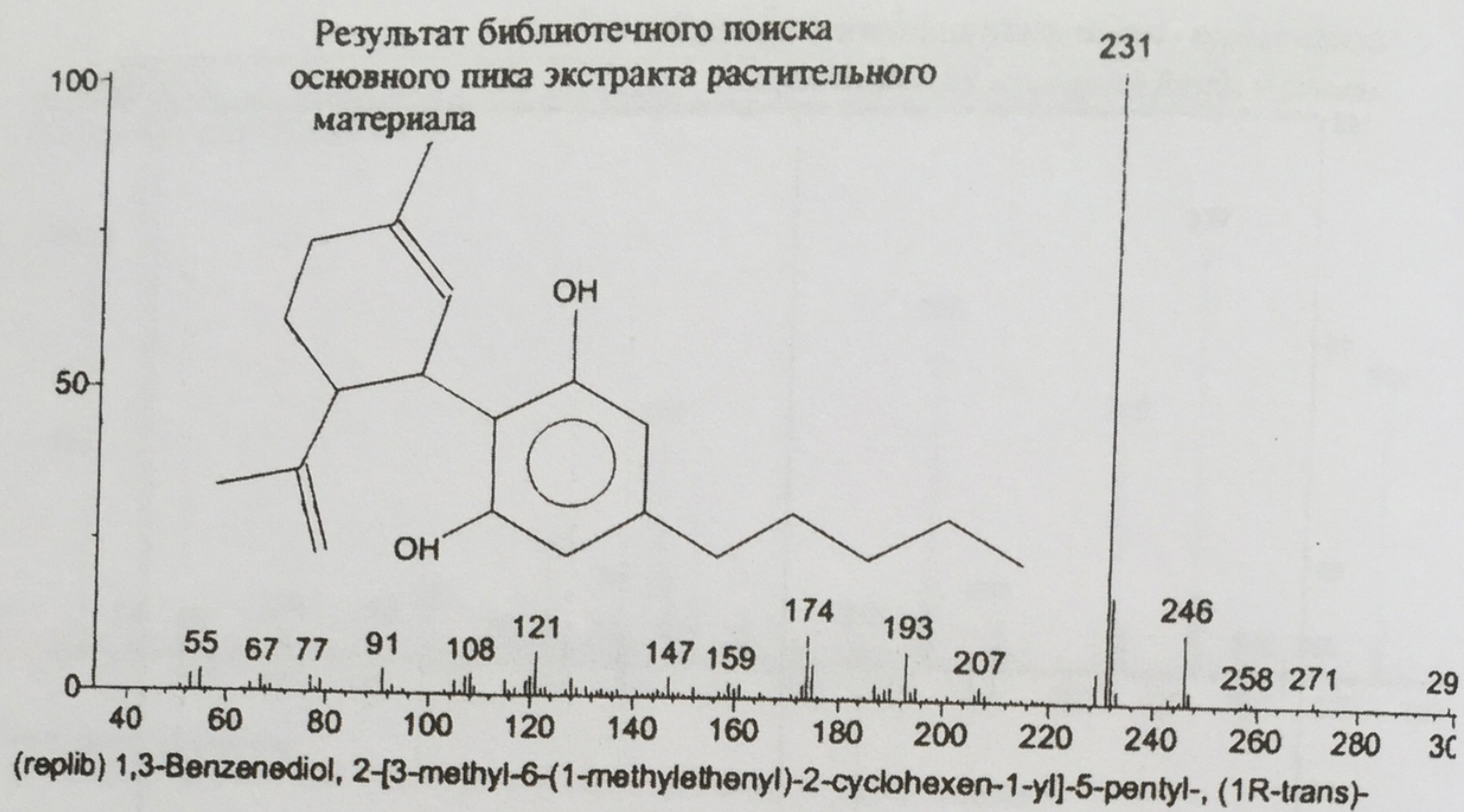
Abundance [39115] 8 targets (+), 162 components (+)



Extracted spectrum (7.106 min)



Хроматограмма экстракта растительного материала, найденного в кармане потерпевшего



Name: 1,3-Benzenediol, 2-[3-methyl-6-(1-methylethenyl)-2-cyclohexen-1-yl]-5-pentyl-, (1R-trans)-
Formula: $C_{21}H_{30}O_2$

MW: 314 CAS#: 13956-29-1 NIST#: 137035 ID#: 19295 DB: replib

Other DBs: HODOC

Contributor: Association of Official Racing Chemists

10 largest peaks:

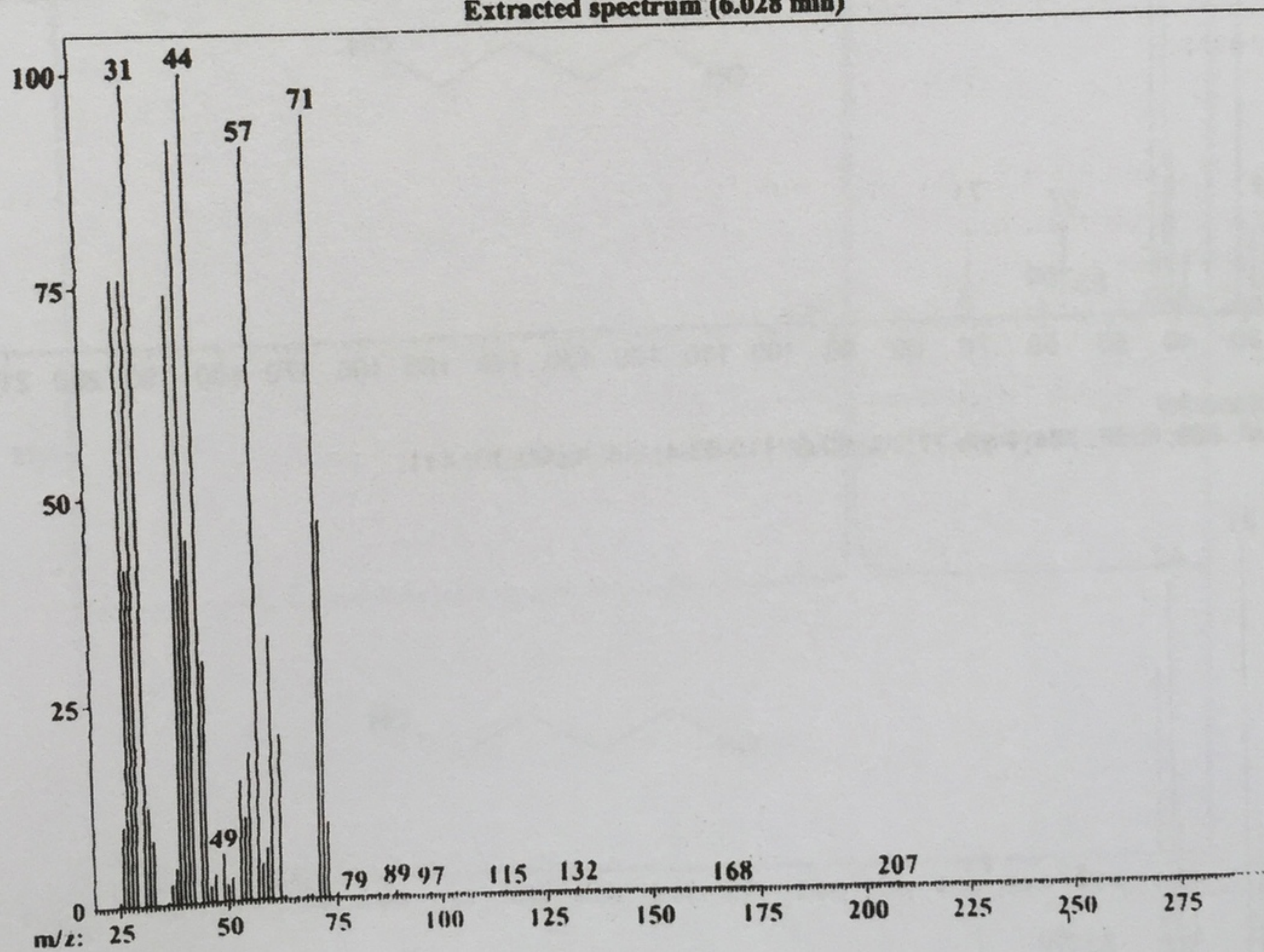
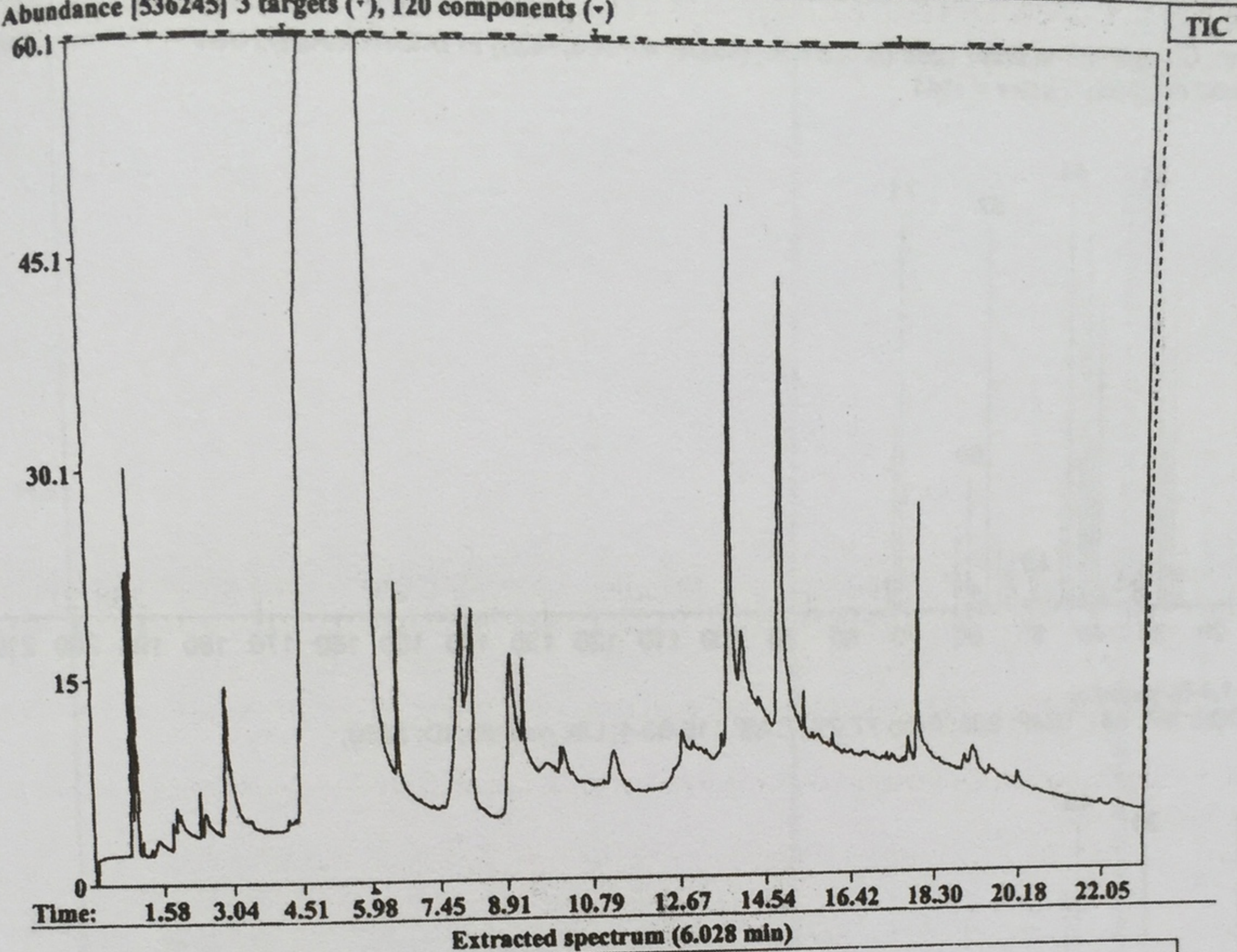
231 999 | 232 172 | 246 115 | 174 105 | 193 80 | 121 72 | 175 57 | 229 50 | 91 39 |

Synonyms:

1. Resorcinol, 2-p-mentha-1,8-dien-3-yl-5-pentyl-
2. $\Delta^1(2)$ -trans-Cannabidiol
3. (-)-trans-Cannabidiol
4. (-)-Cannabidiol
5. Cannabidiol
6. Resorcinol, 2-p-mentha-1,8-dien-3-yl-5-pentyl-, trans-(-)-
7. 1,3-Benzenediol, 2-[3-methyl-6-(1-methylethenyl)-3-cyclohexen-1-yl]-5-pentyl-

GC/MS Analysis - Data:D:\DATA\RED

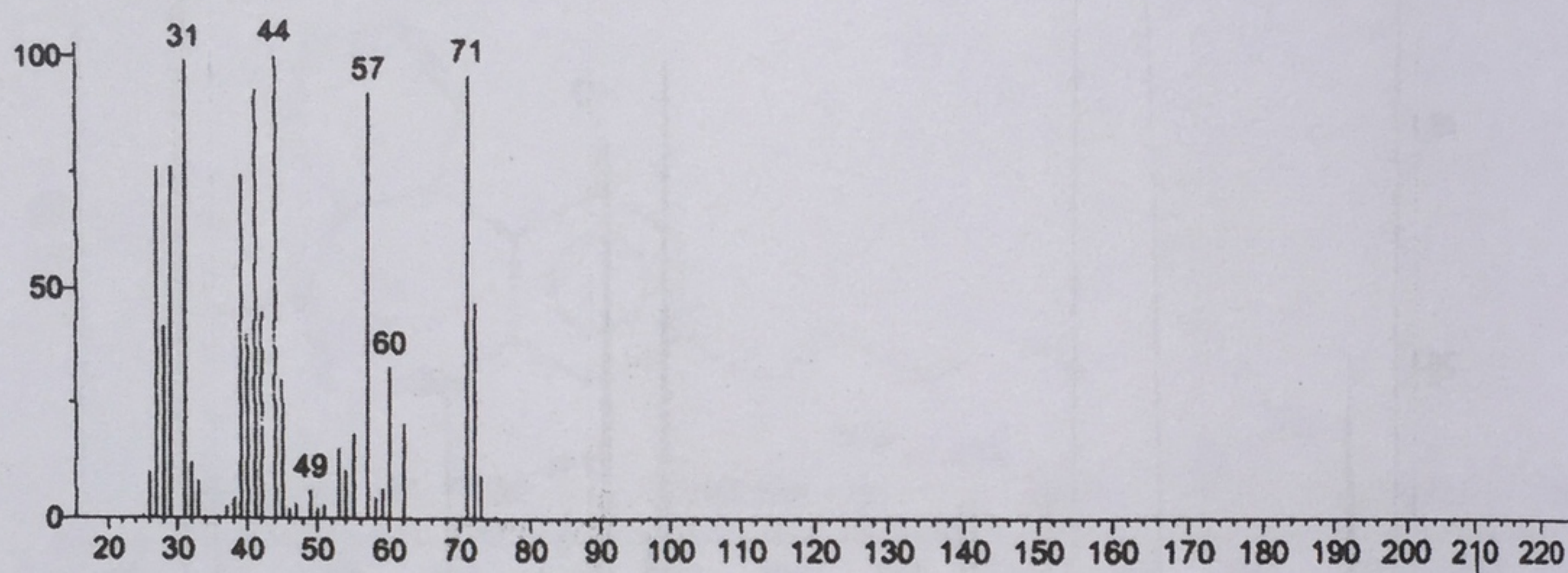
Abundance [536245] 3 targets (*), 120 components (*)



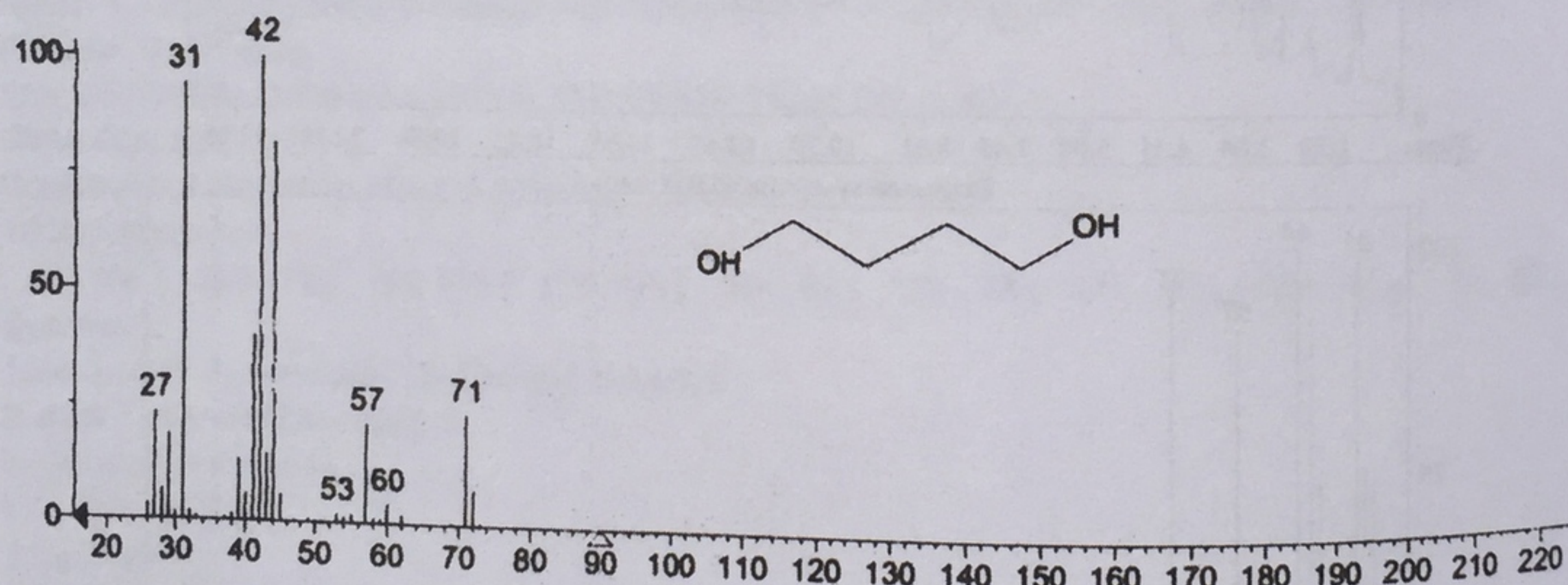
Хроматограмма экстракта препарата, содержащего психоактивные гликоли

** Search Report Page 1 of 1 **

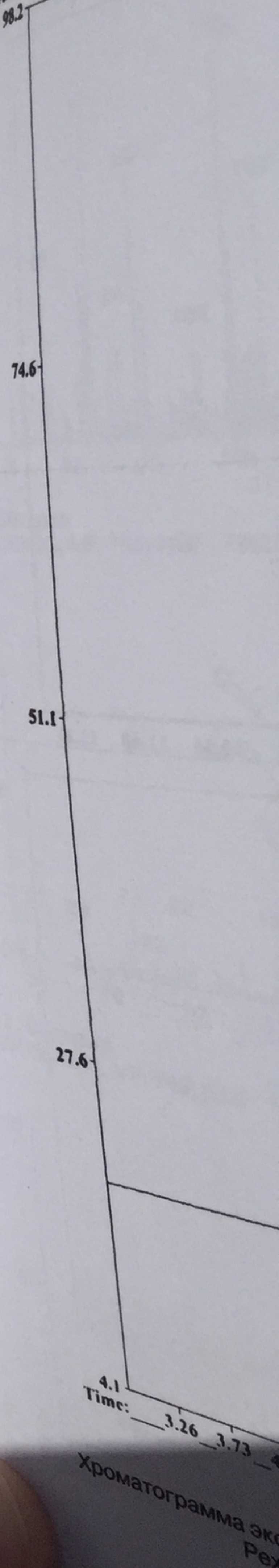
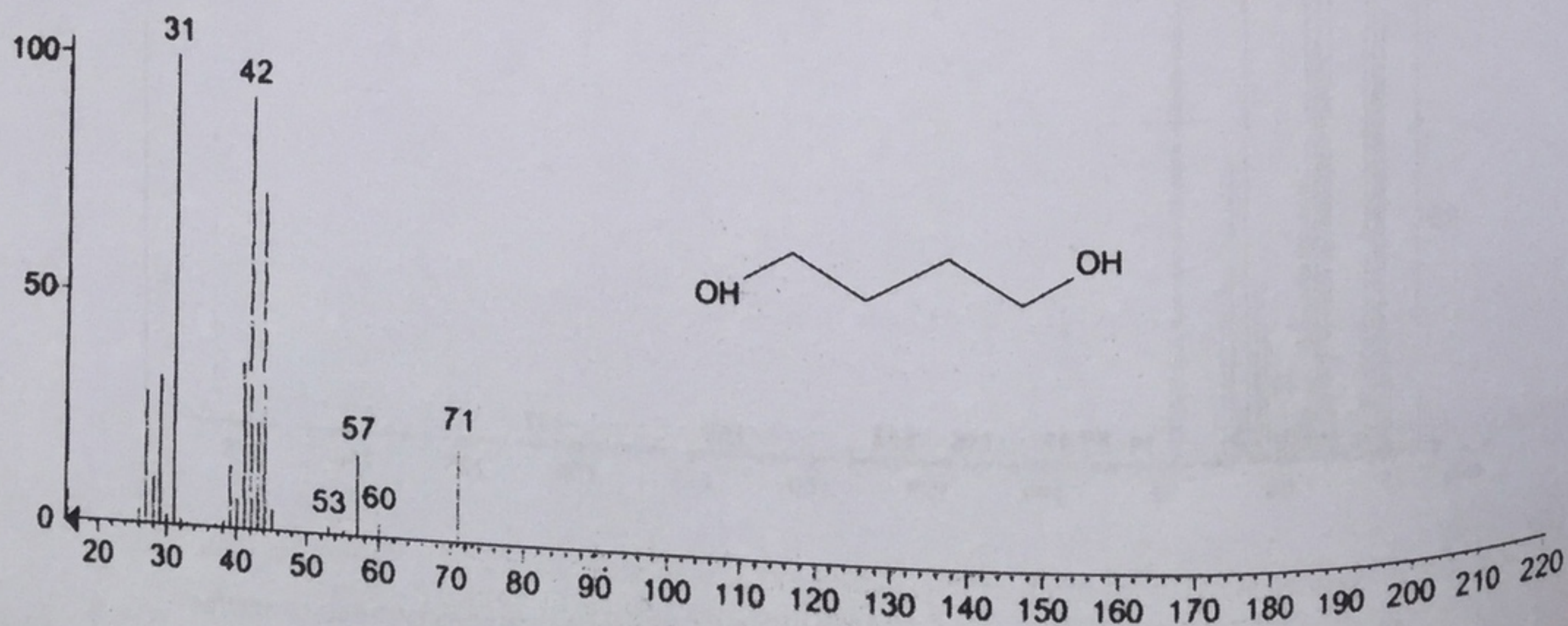
Unknown: Component at scan 1256 (6.028 min) [Model = +45u, -43u] in D:\DATA\RED.RAW
Compound in Library Factor = -141



Hit 1: 1,4-Butanediol
C₄H₁₀O₂; MF: 801; RMF: 806; Prob 77.2%; CAS: 110-63-4; Lib: mainlib; ID: 3250.

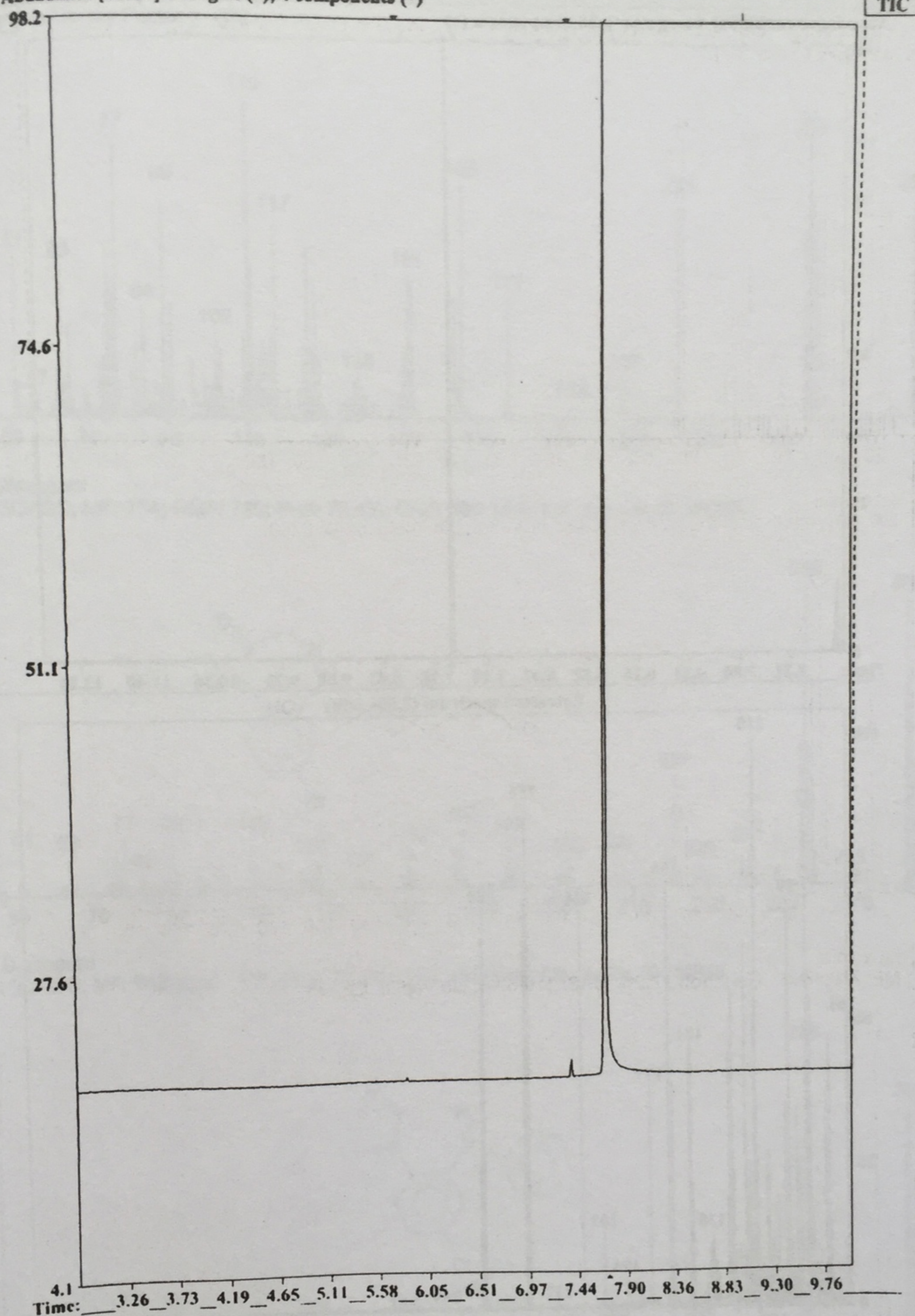


Hit 2: 1,4-Butanediol
C₄H₁₀O₂; MF: 780; RMF: 784; Prob 77.2%; CAS: 110-63-4; Lib: replib; ID: 441.



GC/MS Analysis - Data:D:\DATA\URINE\TST001_011210200011

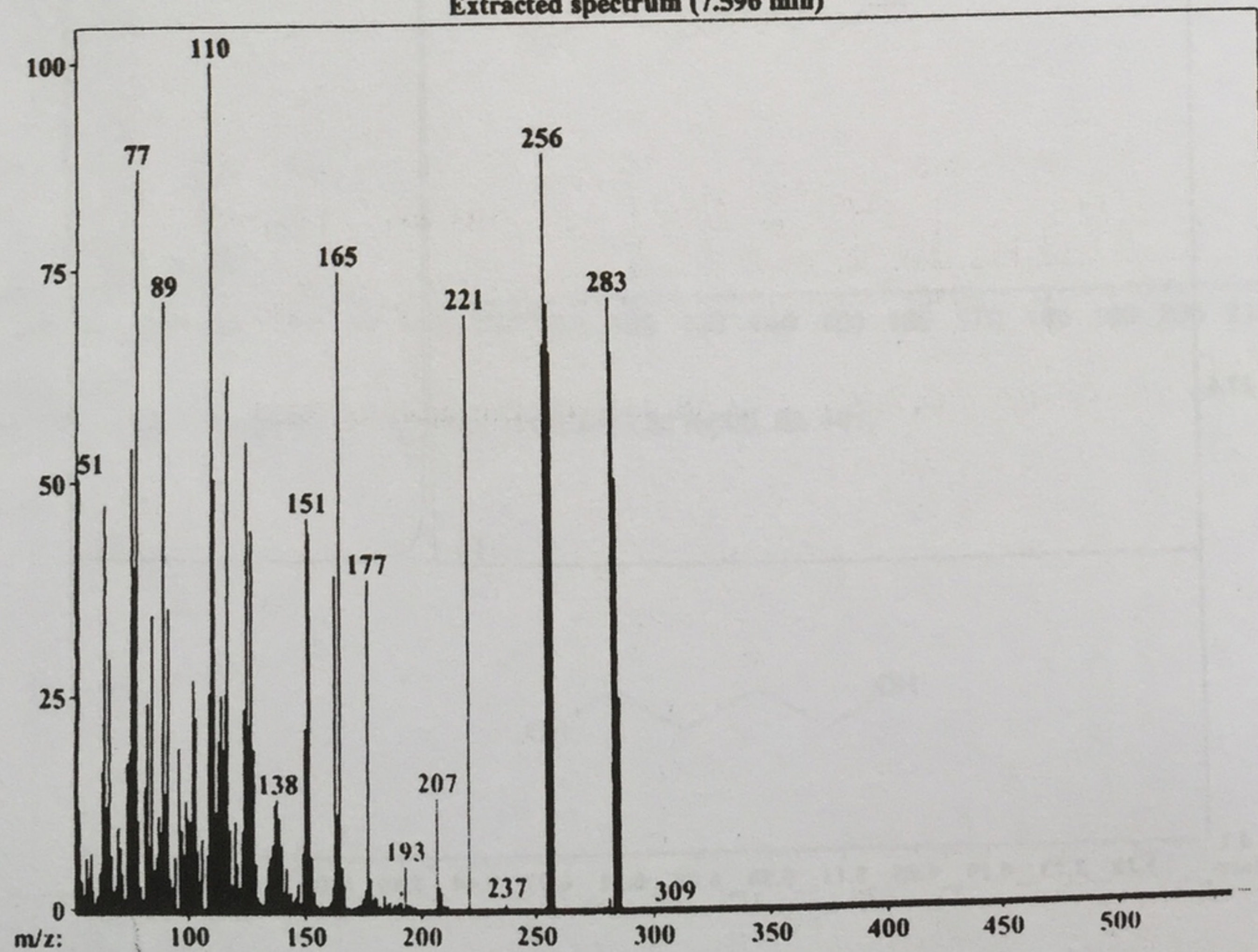
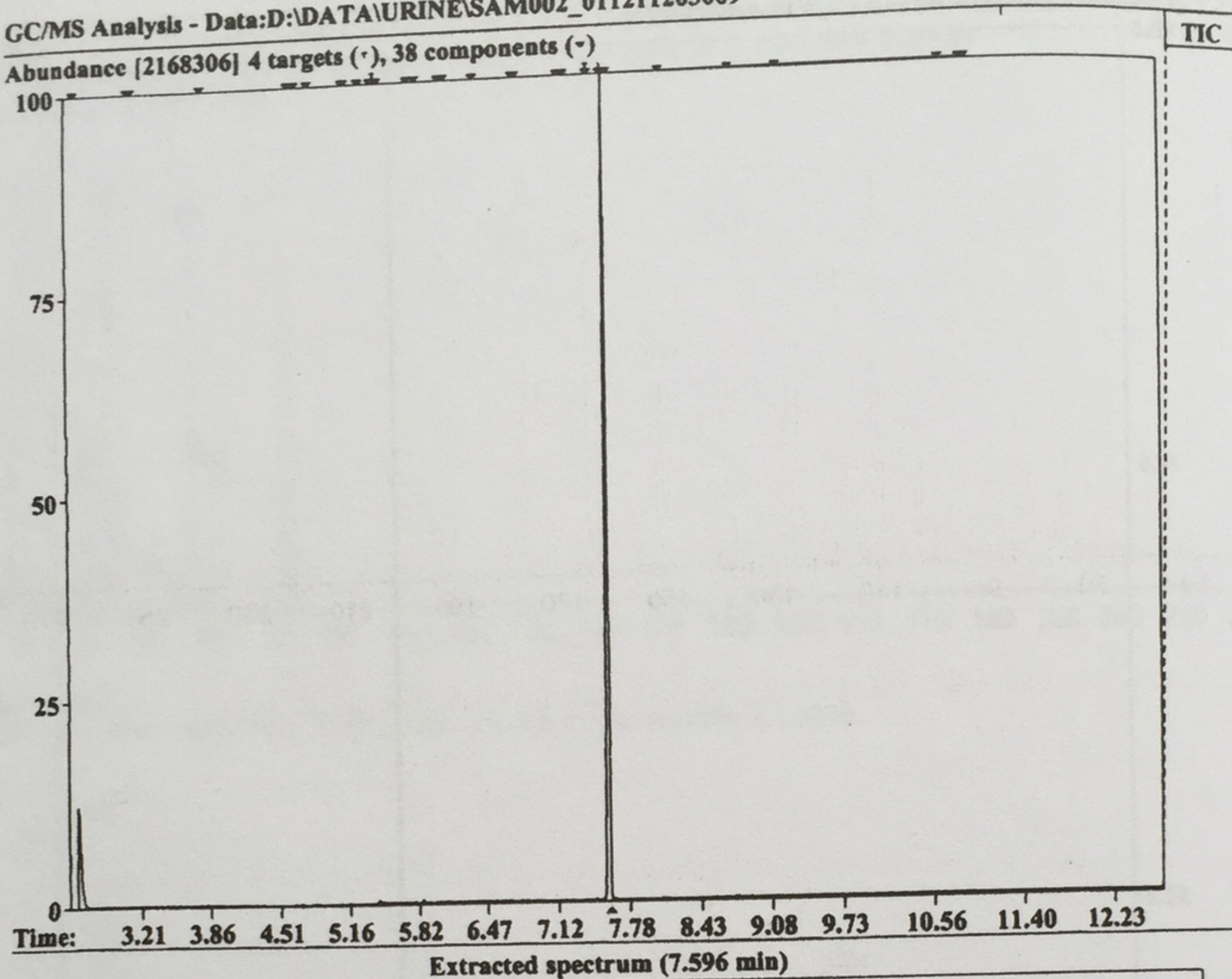
Abundance [16039] 0 targets (+), 4 components (-)



Хроматограмма экстракта волос наркомана, потреблявшего морфин в течение 3 месяцев.
Режимы работы масс-спектрометра: SIM: 285, 268, 162 м/я

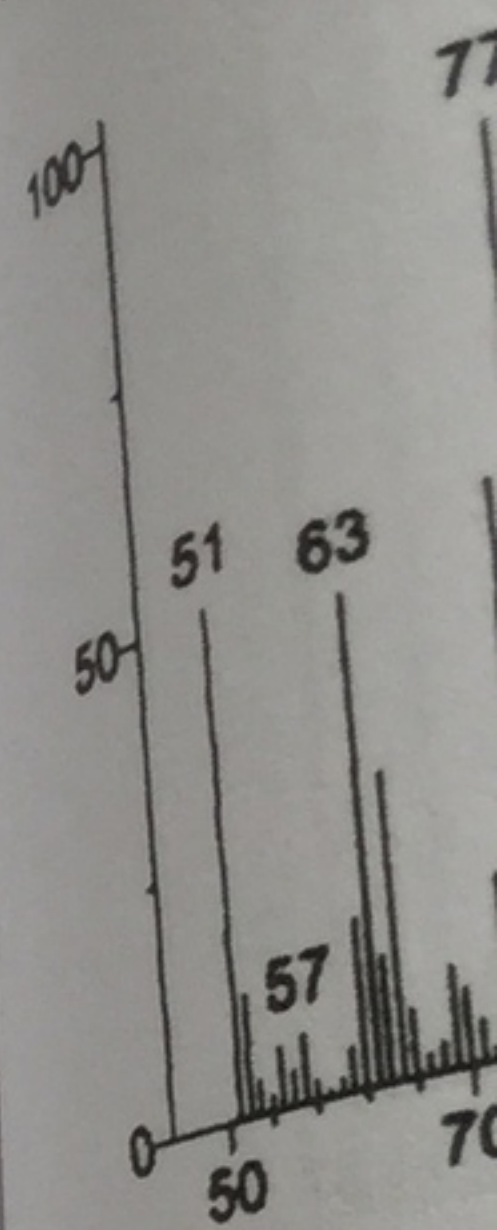
GC/MS Analysis - Data:D:\DATA\URINE\SAM002_011211203009

Abundance [2168306] 4 targets (-), 38 components (-)

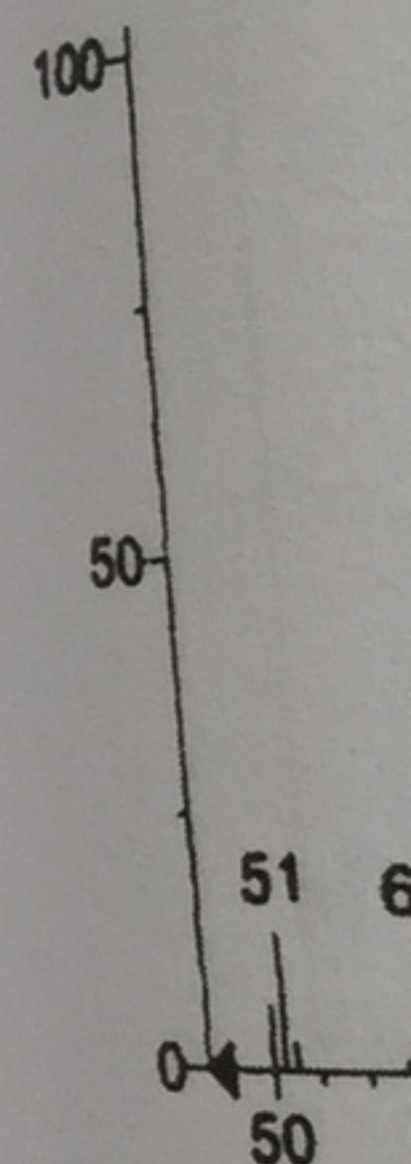


Хроматограмма экстракта неизвестного порошка, применявшегося подозреваемым в качестве одурманивающего средства

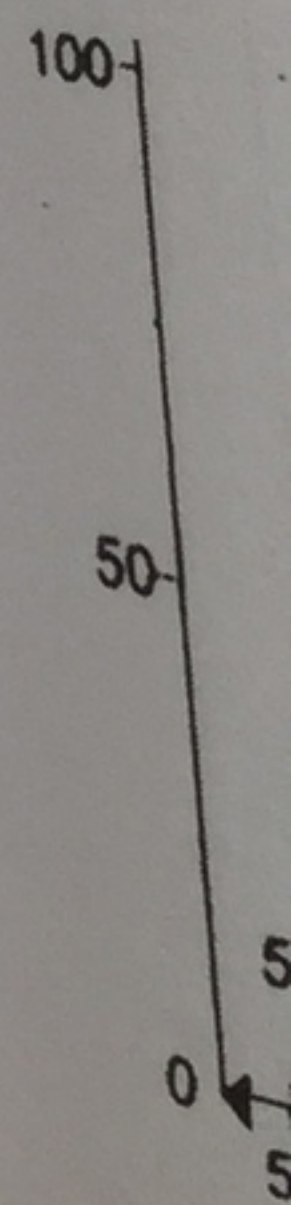
Unknown: Component
Compound in Library



Hit 1: Diazepam
C16H13ClN2O

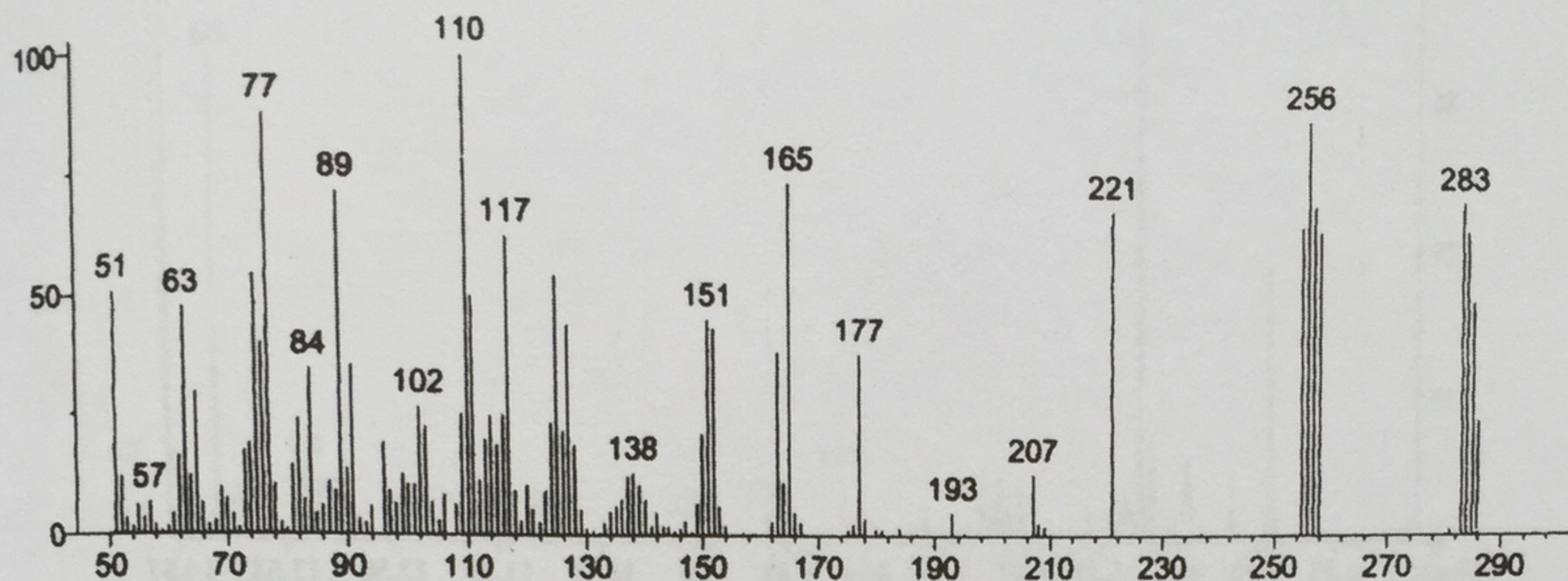


Hit 2: Diazepam
C16H13ClN2O



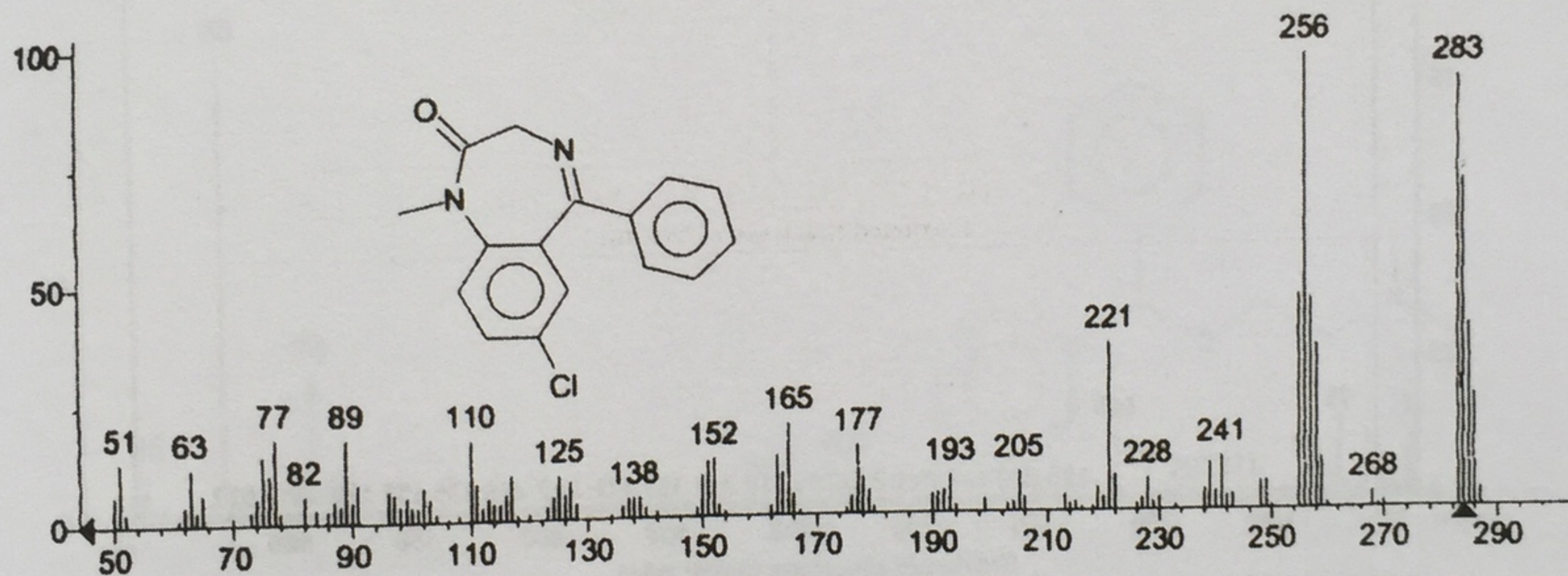
** Search Report Page 1 of 1 **

Unknown: Component at scan 656 (7.596 min) [Model = +84u] in D:\DATA\URINE\SAM002_011211203009.RAW
Compound in Library Factor = -372



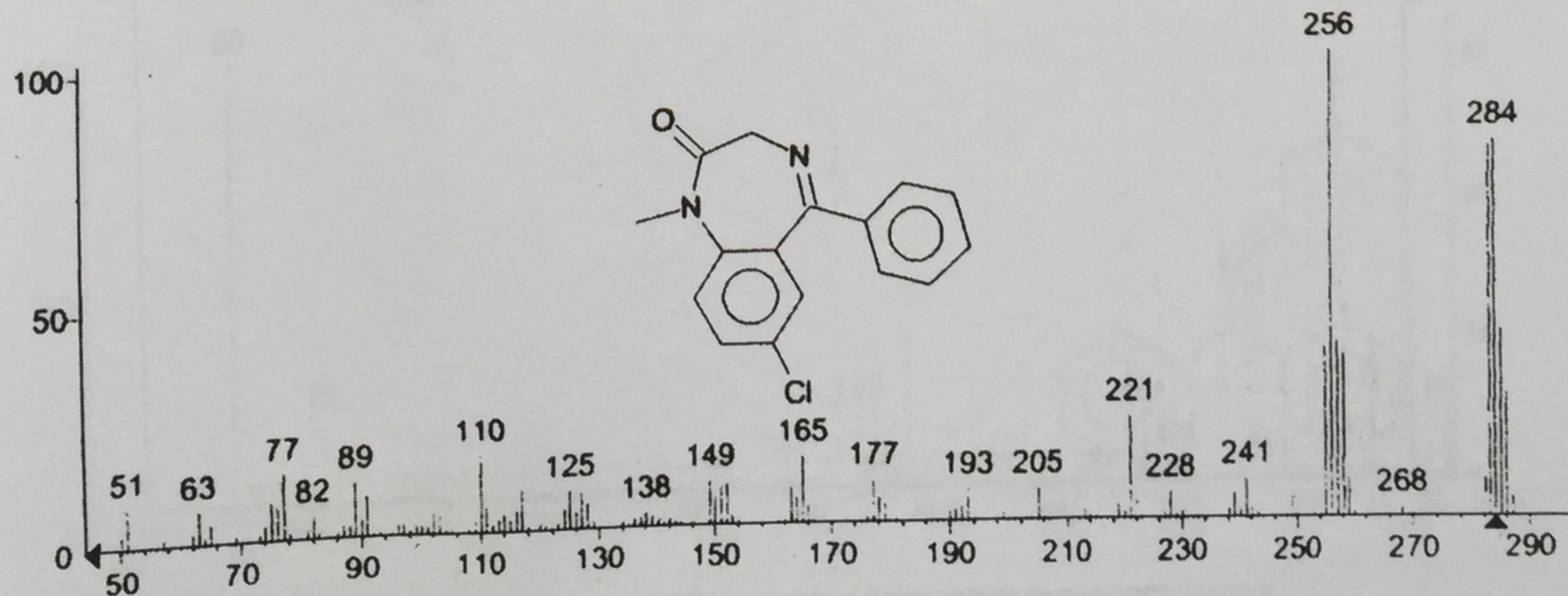
Hit 1 : Diazepam

C₁₆H₁₃ClN₂O; MF: 754; RMF: 780; Prob 73.4%; CAS: 439-14-5; Lib: mainlib; ID: 94090.



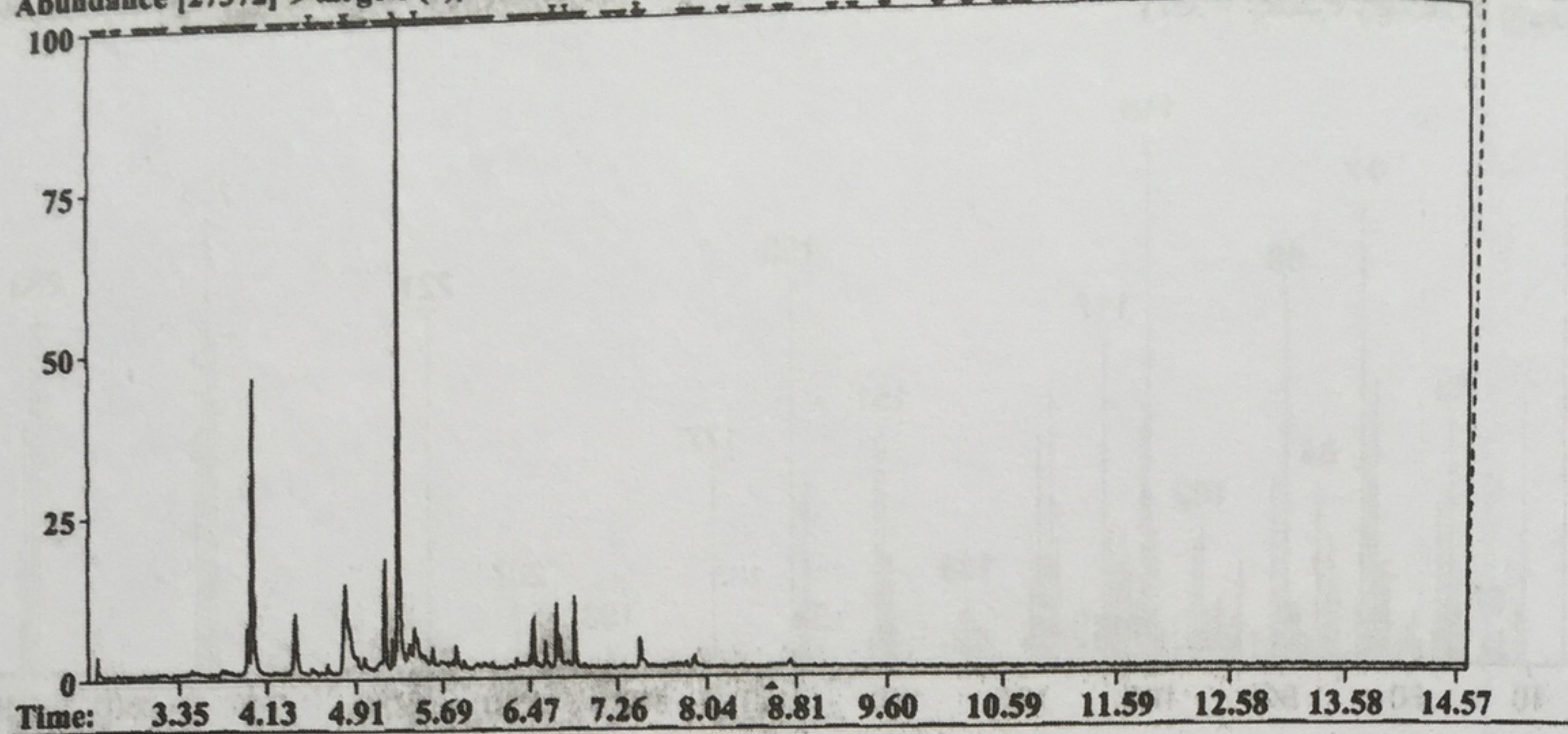
Hit 2 : Diazepam

C₁₆H₁₃ClN₂O; MF: 749; RMF: 750; Prob 73.4%; CAS: 439-14-5; Lib: replib; ID: 19859.



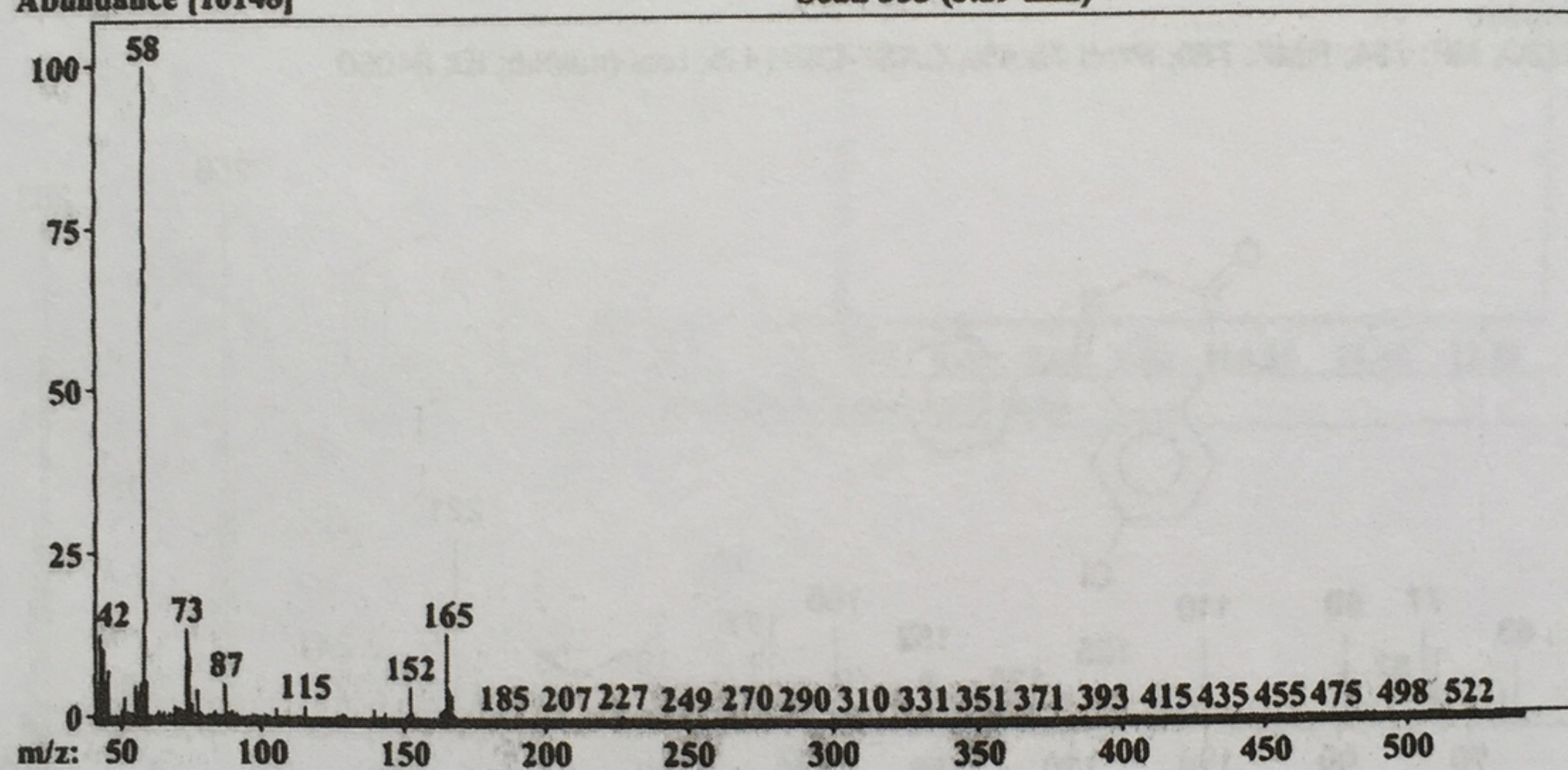
GC/MS Analysis - Data:D:\DATA\URINE\TST001_011210182005

Abundance [27372] 9 targets (*), 106 components (-)

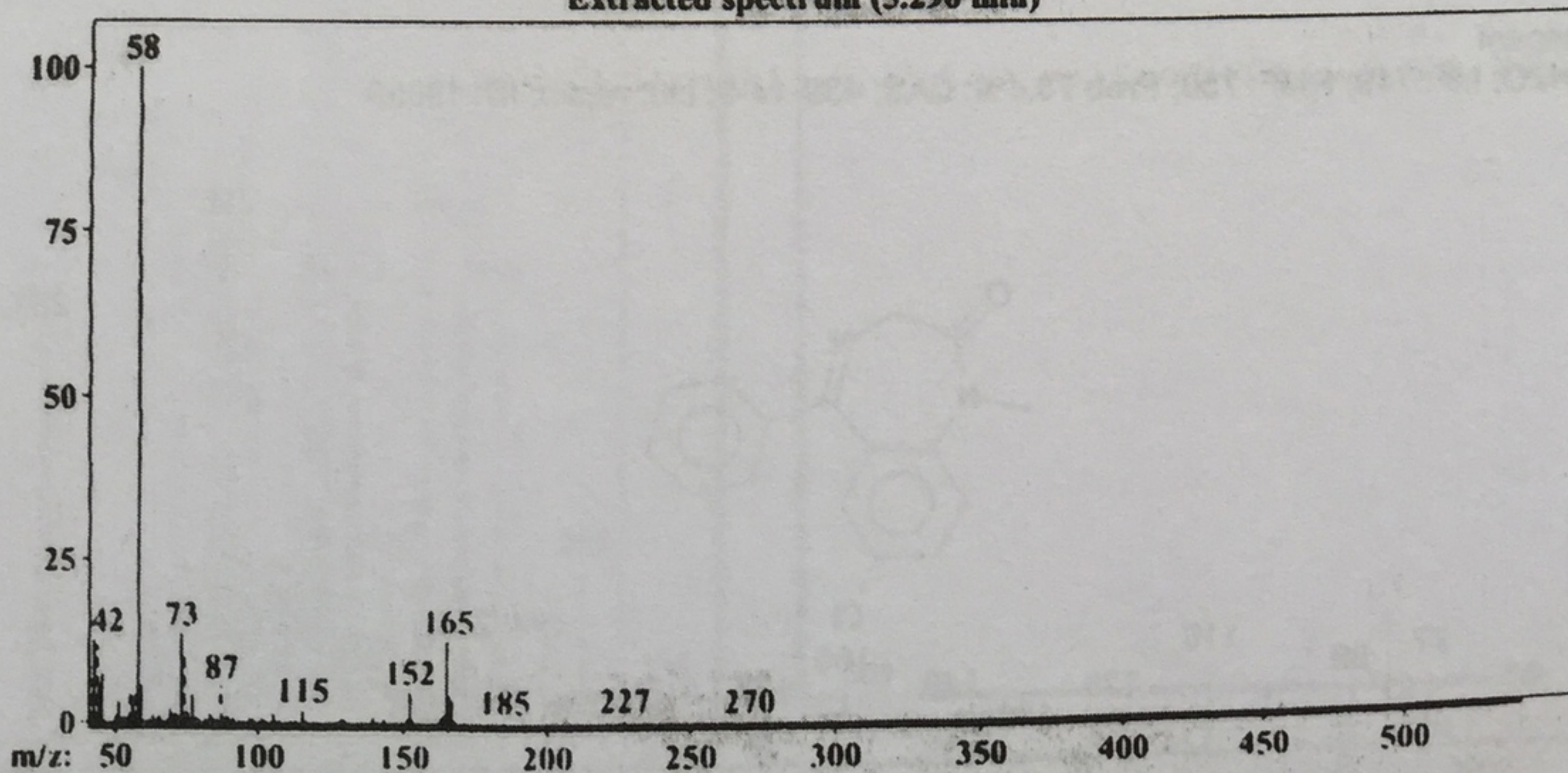


Abundance [10148]

Scan 353 (5.29 min)



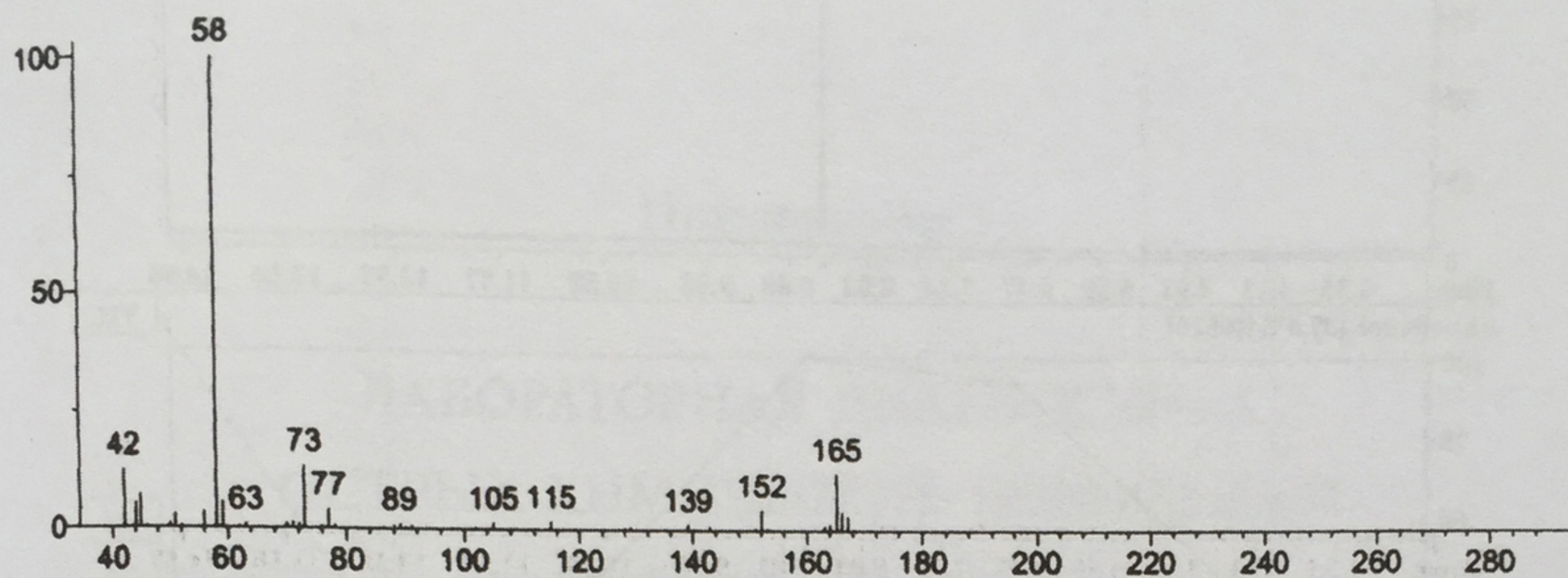
Extracted spectrum (5.290 min)



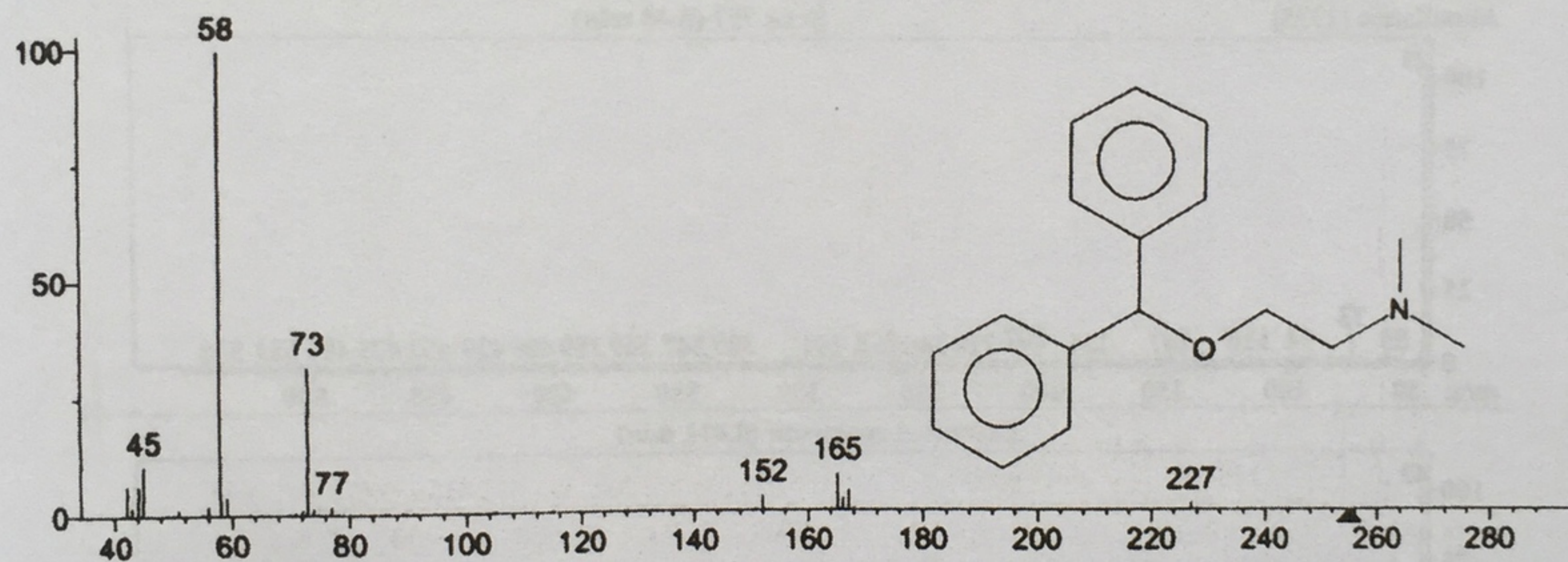
Хроматограмма экстракта мочи водителя, погибшего в ДТП

** Search Report Page 1 of 1 **

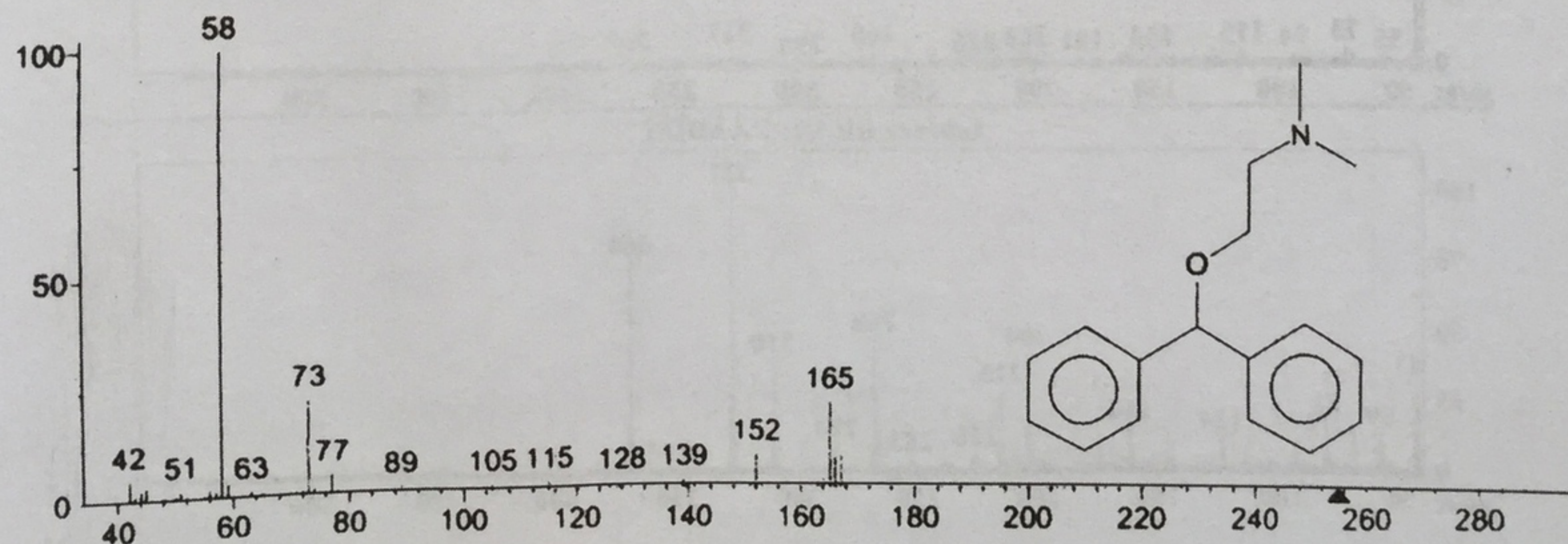
Unknown: Component at scan 353 (5.290 min) [Model = +58u] in D:\DATA\URINE\TST001_011210182005.RAW
Compound in Library Factor = -117



Hit 1 : Diphenhydramine Hydrochloride
C₁₇H₂₁NO; MF: 870; RMF: 897; Prob 41.1%; CAS: 147-24-0; Lib: replib; ID: 5058.

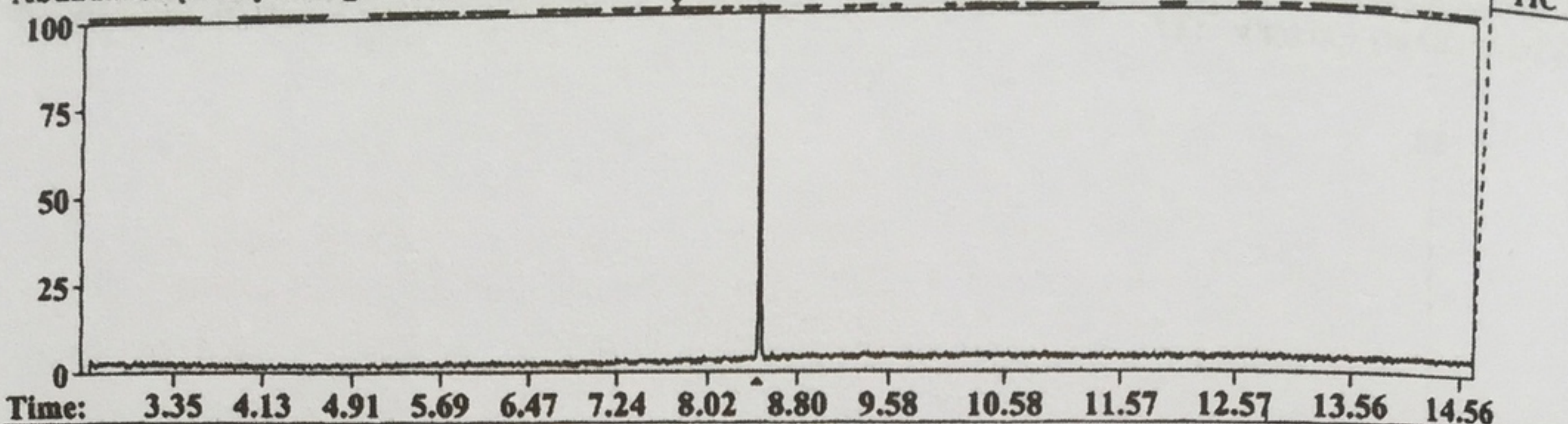


Hit 2 : Diphenylhydramine
C₁₇H₂₁NO; MF: 868; RMF: 888; Prob 37.9%; CAS: 58-73-1; Lib: replib; ID: 5068.

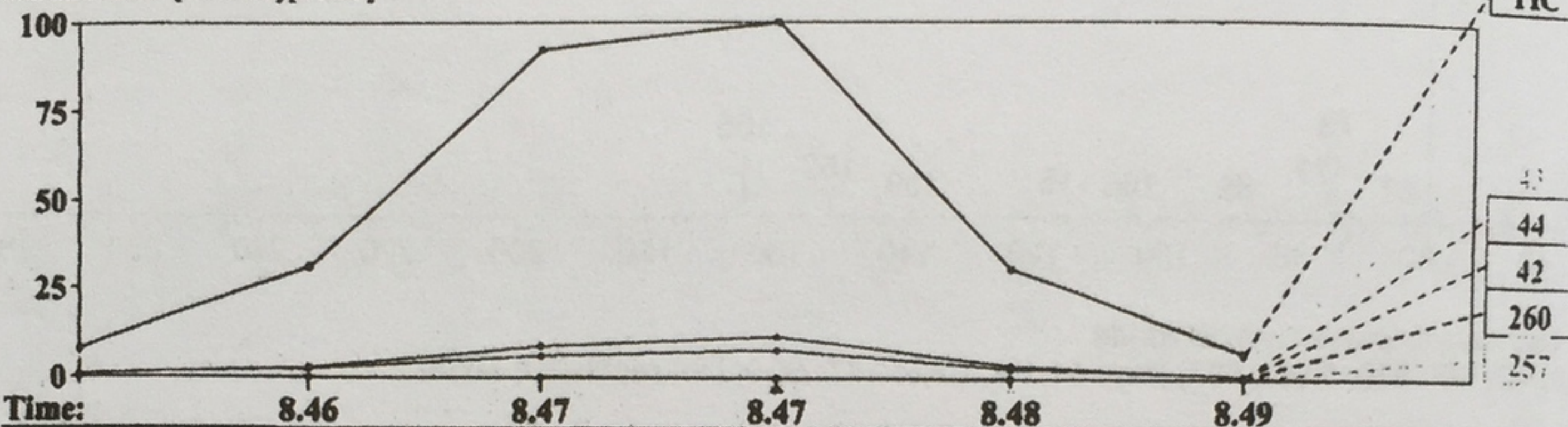


GC/MS Analysis - Data:D:\DATA\URINE\TST001

Abundance [9520] 2 targets (v), 115 components (v)

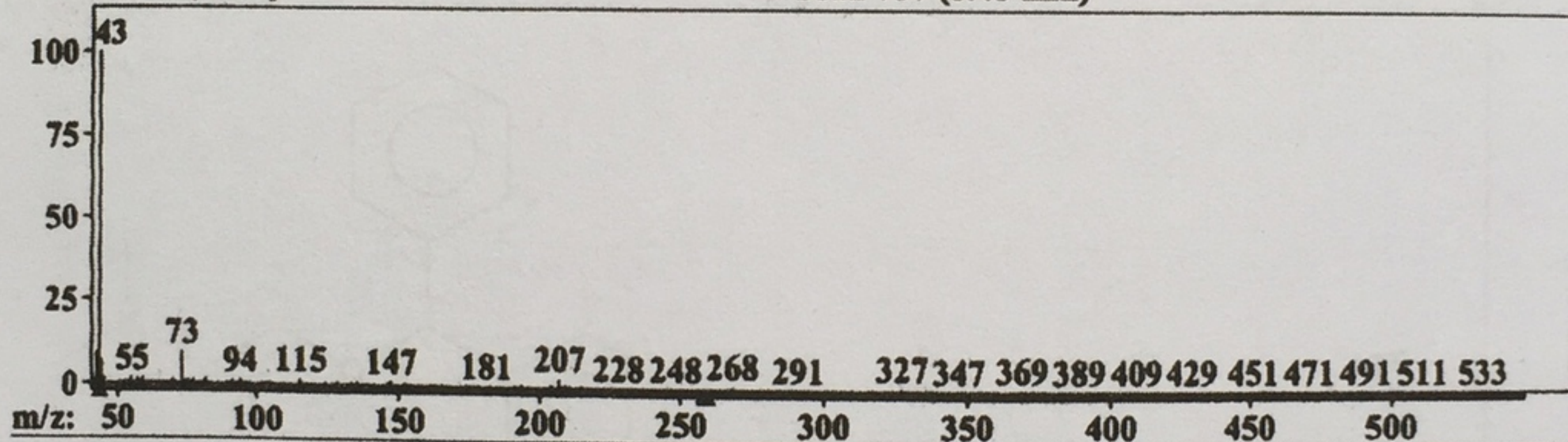


Abundance [37.4%][9520]

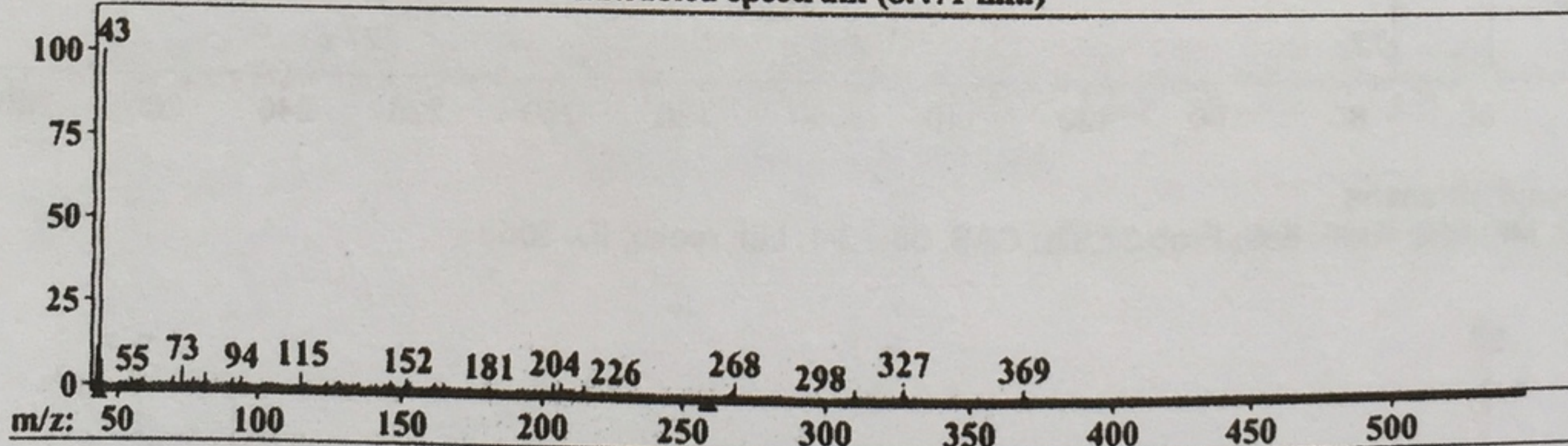


Abundance [1375]

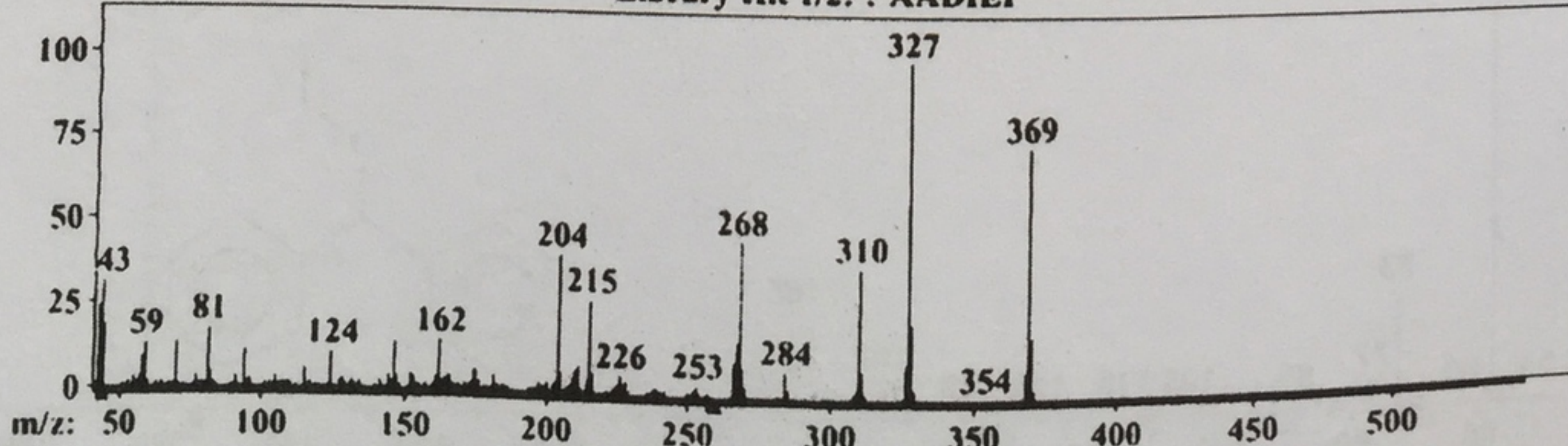
Scan 757 (8.48 min)



Extracted spectrum (8.471 min)



Library Hit 1/2: ? AADIEI



Хроматограмма смыва с поверхности весов, на которых производилась фасовка героина

Приложение 3

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
ОСТРЫХ ХИМИЧЕСКИХ ОТРАВЛЕНИЙ
ПОСОБИЕ ДЛЯ ВРАЧЕЙ

Введение. Цели и задачи химико-токсикологического исследования

Основные принципы диагностики острого отравления нами были изложены в пособии «Острые отравления бытовыми и промышленными химическими веществами» (1997). Здесь мы лишь напомним, что диагностику обычно проводят комплексно, учитывая клинические признаки, отмеченные у больного (клиническая диагностика), используя методы химико-токсикологического исследования биосред организма (химико-токсикологическая диагностика), а также различные дополнительные инструментальные, функциональные и биохимические методы исследования. Одной из важных задач клинической и вспомогательной (инструментальной, функциональной и биохимической) диагностики является по возможности точное выявление вещества или группы веществ, вызвавших отравление для определения основного направления проведения химико-токсикологического исследования.

Химико-токсикологическая диагностика

Дифференциальная диагностика отравления по клинической картине далеко не всегда позволяет определить конкретное вещество, особенно в случае употребления нескольких отравляющих веществ и на фоне алкогольного опьянения. Она должна быть подтверждена и дополнена системой быстрой, надежной, достаточно чувствительной и воспроизводимой лабораторной диагностики токсичных веществ в наиболее доступных биологических средах организма (кровь, моча). Особенностью, отличающей лабораторную диагностику отравлений в токсикологической клинике от судебно-медицинской, является прежде всего экстренность, когда продолжительность проведения анализа не должна превышать 1–2 ч, поскольку это необходимо для проведения неотложной терапии; кроме того ограниченный объем и вид материала для исследования – как правило, это кровь и моча, могут быть содержимое желудка и промывные воды, фекалии, спинномозговая жидкость, слюна. Поэтому никогда не проводится поиск т.н. «неизвестного яда», как это принято при проведении судебно-медицинской экспертизы. Обычно, основываясь на результатах клинической диагностики, лечащий врач-токсиколог указывает в направлении наименование вещества или группы веществ, подлежащих исследованию. По этой же причине исследование биосред, направляемых из других стационаров данного города в случае необходимости проведения химико-токсикологического обследования, осуществляется только после согласования с врачом-токсикологом, который, основываясь на имеющихся сведениях о пациенте, определяет необходимость проведения исследования в каждом конкретном случае и направление поиска токсичных веществ.

Химико-токсикологическое исследование может проводиться не только с диагностической целью, но и для оценки эффективности проводимой детоксикации, определения фазы течения отравления (токсикогенной или соматогенной).

Очень важным моментом является выбор метода исследования и оценка полученного результата. Так, в ряде случаев лечащему врачу бывает достаточно качественного определения, например наличия бензодиазепинов методом тонкослойной хроматографии, поскольку выбор способа лечения не зависит от названия лекарственного препарата данной группы; в случае отравления трициклическими антидепрессантами желательно определить конкретное вещество, в частности amitriptyline как наиболее токсичный в этой группе. При отравлении высокотоксичными веществами, например, метанолом, этиленгликолем, дихлорэтаном, соединениями металлов и др., необходимо иметь количественный результат, т.е. определение концентрации яда в крови, поскольку от этого будет зависеть выбор метода детоксикации. Естественно об этом следует говорить только в случае, когда в лаборатории имеются технические возможности для проведения различных методик. Для осуществления такого подхода к выбору методики необходимо, чтобы врач лаборатории работал в контакте с лечащим врачом. Это поможет правильной оценке полученного результата. В частности, при сопоставлении данных лабораторного исследования с имеющейся клинической картиной отравления могут быть следующие варианты:

– полное их соответствие, и тогда процесс лабораторной диагностики можно считать завершенным;

– клиническая картина дает основание предположить, что выявлена только часть токсичных веществ, вызвавших отравление, и следовательно исследование нужно продолжить;

– полученные результаты полностью расходятся с клинической картиной заболевания, что требует проведения не только повторных или дополнительных химико-токсикологических исследований, но и уточнения клинического диагноза путем применения различных вспомогательных методов диагностики, уточнения анамнеза, приглашения различных специалистов-консультантов.

Организация химико-токсикологической лабораторной службы

В связи с вышеизложенными особенностями совершенно ясно, что химико-токсикологическая лабораторная служба должна располагаться в непосредственной близости и находиться в тесном контакте с клиническим подразделением, оказывающим помощь больным с острыми отравлениями, т.е. практически быть в составе токсикологического отделения (центра). Учитывая это, в приказе Минздрава СССР № 475 от 6.05.1980 г. «Об улучшении стационарной специализированной медицинской помощи при острых отравлениях», впервые выделившим в номенклатуре клинических врачебных специальностей должность врача-токсиколога и узаконившим отделения (центры) лечения отравлений и штатные нормативы этих подразделений, введена в лабораторию больницы, имеющей в составе указанное отделение, 1 должность врача-лаборанта и 1 круглосуточный пост фельдшера-лаборанта (Приложение 4 к упомянутому приказу); аналогичное штатное расписание содержится в дублирующем приказе Минздрава РСФСР № 484 от 4.08.1981 г. «О мерах по дальнейшему улучшению качества оказания медицинской помощи населению РСФСР при острых отравлениях». Несмотря на то, что оба приказа не утратили силу до настоящего времени, в 1990 г. было выпущено Информационное письмо Министерства здравоохранения СССР № 04-6/64-6 от 27.03.90 г. «Организация стационарной медицинской помощи при острых отравлениях химической этиологии», в котором рекомендовано ввести в состав отделения лечения отравлений химико-токсикологическую лабораторию. В штате этой лаборатории должны быть 6 должностей врача-лаборанта и 6 лаборантов для обеспечения круглосуточной работы, а также 2 должности санитарки. Кроме того, указан ориентировочный норматив химико-токсикологических исследований – 12,4 ч. на 1 стационарного больного с острым отравлением.

Выделение самостоятельной лабораторной химико-токсикологической службы потребовало организации подготовки соответствующих врачей-специалистов. В настоящее время базовое обучение и последующее усовершенствование проводится на кафедре токсикологической химии Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова (тел.: 290-5399, 290-4236). Кроме того, обучение на рабочем месте можно пройти на кафедре клинической токсикологии Российской медицинской академии последиplomного образования в г. Москве (тел.: 921-9646, 928-4545) или в лаборатории Московского городского центра лечения отравлений (тел.: 928-2603, 929-1093).

Показания и противопоказания к применению метода

Показанием для проведения описанных в Пособии лабораторных химико-токсикологических исследований являются случаи острых отравлений химической этиологии (для подтверждения или уточнения клинического диагноза), диагностически неясные случаи (для проведения дифференциальной диагностики), необходимость оценки эффективности проводимого лечения отравления, в частности – методов детоксикации; при проведении судебно-медицинского исследования крови, мочи, содержимого желудка; для уточнения факта употребления наркотических, психотропных и других одурманивающих веществ в наркологической практике. Противопоказаний нет.

Материально-техническое обеспечение метода

Описанные в Пособии методики могут проводиться на любом стандартном оборудовании, имеющемся в распоряжении лаборатории. Дополнительно рекомендованные Система экстренной токсикологической диагностики «REMEDI» производства фирмы Bio-Rad (США), имеет номер гос. регистрации 95/312 от 28 октября 1995 г., иммунофлюоресцентный анализатор TDx фирмы АБВОТ (США) имеет № гос. регистрации 85/28, приложение по реагентам – № 97/1180.

Описание методов

1. Методы, применяемые в химико-токсикологическом анализе

1.1. Иммунные методы

1.1.1. Иммунохимические методы анализа.

Современные иммунохимические методы анализа лекарственных и наркотических средств обладают достаточно высокой чувствительностью, групповой специфичностью, простотой исполнения, позволяют анализировать одновременно большое количество проб без специальной подготовки и потому удобны для скрининг-диагностики.

В основе этой группы методов лежит реакция между определяемым лекарственным веществом (антигеном) и специфичными к нему антителами. Для визуализации результатов реакции в один из компонентов вводится «метка». В зависимости от природы метки (метода детектирования) различают несколько видов иммунного анализа. Виды, наиболее употребимые в практике токсикологического анализа, приводятся в таблице 1.

Таблица 1. Классификация иммунохимических методов анализа

Метод	Способ детектирования	Чувствительность
Радиоиммунный анализ (РИА)	Радиоактивность	0,1–20 нг/мл
Иммуноферментный анализ (ИФА)	Ферментная активность	0,1–100 нг/мл
Поляризационный флуороиммунноанализ (ПФИА)	Изменение поляризации флуоресценции	10–80 нг/мл

В настоящее время отечественными и зарубежными производителями выпускаются готовые коммерческие наборы реактивов – диагностикумы, позволяющие определять основные классы лекарственных и наркотических веществ с гарантированным пределом определения 50–500 нг/мл.

В реакционную среду помещают определяемое вещество (антиген) и «меченый» антиген, которые конкурентно взаимодействуют с ограниченным числом мест связывания антител. В иммуноферментных методах в качестве метки используются ферменты (как правило оксидазы), которые окисляют хромогенный субстрат. При связывании меченого антигена с антителом фермент теряет свою активность и не изменяет окраски хромогенного субстрата. О степени прохождения реакции судят по изменению окраски, которая имеет зависимость от концентрации определяемого вещества. По технике проведения различают гомогенный и гетерогенный ИФА. В гомогенном ИФА все компоненты реакции находятся в одном агрегатном состоянии – в растворе. В наиболее распространенных модификациях гетерогенного анализа антитела иммобилизуются на твердом носителе (пробирках, планшетах, бусинах). Хромогенный субстрат в этом случае добавляется после удаления непрореагировавших компонентов. Он взаимодействует с ферментом, связанным с иммобилизованным антителом, и меняет окраску. Если концентрация определяемого вещества значительно превышает концентрацию меченого антигена, то после удаления последнего из реакционной среды ферменты в системе отсутствуют и окраска не изменяется (положительный ответ). Изменение окраски регистрируется на фотокolorиметре, обычно выполненном в виде анализатора для диагностикумов конкретной фирмы. Поскольку антитела специфичны к определенному соединению, то существуют наборы отдельно на каждый вид лекарственных и наркотических соединений. Например, для опиатов, каннабиноидов, барбитуратов, бензодиазепинов, бензоилэкгоина (метаболит кокаина) и др.

Гомогенный ИФА более экспрессный. Время на каждый тест 1–30 мин, включая обработку результатов. Предел обнаружения 10^{-4} – 10^{-6} г/мл. Гетерогенный анализ более чувствителен 10^{-6} – 10^{-8} г/мл, но длительнее по исполнению (2–3 ч.).

В ИФА часты случаи ложноположительных или ложноотрицательных результатов, поскольку некоторые компоненты крови, метаболиты лекарственных средств и т.п. могут изменять скорость ферментативных реакций. Ферменты, как и все белки, теряют активность под действием таких факторов, как нагревание, замораживание, разведение образцов, рН, присутствие солей тяжелых металлов, антикоагулянтов, микроорганизмов. Поэтому результаты ИФА значимы только в комбинации с подтверждающими методами.

1.1.2. Поляризационный флуороиммунноанализ (ПФИА)

Наиболее чувствительным и удобным в использовании среди иммунологических методов является ПФИА. Принцип проведения реакции тот же, что в гомогенном ИФА. В качестве метки используется флуоресцеин. Изменение поляризации флуоресценции зависит от степени связывания меченого антигена с антителом. Для регистрации результатов используется специальная оптическая система, выполненная в виде анализатора. Фирмой «Эббот» (США) выпускается автоматизированная система TDx (анализатор – № гос. регистрации П-8-242-МТ № 85/28, реагенты – № 97/1180), а в России флуоресцентные анализаторы АФП-2. ПФИА имеет преимущества перед ИФА в чувствительности – 200 нг/мл, стабильности метки, независимости от рН среды, температуры, сопутствующих веществ, характерных для ферментных реакций, в скорости и простоте проведения анализа.

1.1.3. Иммунохроматографический анализ (ИХА)

Перспективным вариантом иммуноанализа являются иммунохроматографический анализ (ИХА), который в литературе называют еще «стрип-тест», экспресс-тест, тест-полоски и т.п. Это связано с компактностью, быстротой и простотой выполнения и оценки результатов анализа.

В тест-зоне полоски нанесены искусственные антигены (подобные анализируемым веществам). Антитела к ним, связанные с красителем, также нанесены на полоску у линии погружения ее в исследуемый образец биожидкости. При погружении теста в жидкость, последняя начинает мигрировать по принципу тонкослойной хроматографии. Вместе с жидкостью движутся антитела. Если в жидкости нет исследуемого антигена (наркотика), то антитела доходят до вторичных антигенов, связываются с ними, образуя окрашивание в тест-зоне. Если же исследуемый антиген (наркотик) присутствует в жидкости, он связывает антитела и окрашивания в тест-зоне не наблюдается. Отсутствие или появление окрашивания в тест-зоне говорит о положительном или отрицательном результате анализа, соответственно.

В настоящее время тест-полоски производят несколько фирм. Основным отечественным производителем является научно-производственная фирма «Прогрессивные Био-Медицинские Технологии». Ими предлагаются тесты как на отдельные группы наркотиков, так и мультитесты – на 4 или 6 групп одновременно. Чувствительность для опиатов, метадона, кокаина, бензодиазепа, барбитуратов – 300 нг/мл, каннабиноидов – 50 нг/мл, метамфетамина – 500 нг/мл, амфетамина – 1000 нг/мл. Отсутствует перекрестное реагирование со многими лекарствами в концентрациях до 100 мкг/мл.

Общей проблемой для всех иммунохимических методов является кросс-реактивность. Поскольку антитела формируют места связывания не на конкретную молекулу, а на некоторый характерный фрагмент молекулы, то и иммунная реакция может происходить с веществами, имеющими в своей структуре этот фрагмент. Поэтому при иммунном анализе определяется не конкретное вещество, а группа соединений, то есть метод имеет групповую специфичность. Положительный ответ дается, например, на опиаты (а не на морфин), барбитураты (а не на гексенал) и т.д. Кроме того, возможна реакция и с другими химическими соединениями, не принадлежащими к этой группе лекарств. Обычно каждый набор характеризуется относительной реактивностью к другим соединениям, что позволяет исключить возможный ложноположительный результат.

Таким образом, иммунные методы – это современные методы скринингового экспресс-анализа лекарственных и наркотических веществ, имеющие отрицательное аналитическое значение и требующие обязательного подтверждения другими методами. Сведения о иммунных методах анализа токсических веществ имеются в литературе [7, 8, 43, 44, 47, 58, 59, 70].

1.2. Спектральные методы

К спектральным относятся методы, использующие свойство молекул или атомов веществ поглощать или испускать излучения определенной длины волны. Характер спектра специфичен для каждого соединения, а интенсивность в определенном интервале концентраций пропорциональна этой концентрации, что предоставляет возможность как идентификации, так и количественной оценки анализируемого вещества.

По физической природе используемого излучения выделяются следующие методы:

- 1) УФ-спектрофотометрия;
- 2) ИК-спектроскопия;
- 3) колориметрия в видимой области спектра;
- 4) атомно-адсорбционная спектрометрия (ААС);
- 5) масс-спектрометрия (МС);
- 6) флуоресцентная спектрофотометрия и др.

В химико-токсикологическом анализе эти методы могут использоваться как самостоятельно, так и в сочетании с другими, обычно хроматографическими методами (для детектирования).

Например, ААС используется для анализа на «тяжелые» металлы. Проба вводится в источник света, где она нагревается и испаряется. Попавшие в газовую фазу молекулы распадаются на атомы, которые переходят в возбужденное состояние. Самопроизвольно возвращаясь в нормальное состояние, они испускают избыточную энергию в виде квантов света. Линии спектра характерны для каждого металла, а их интенсивность пропорциональна концентрации его в пробе. Чувствительность метода от 0,1 ч на млн. в пробе, в зависимости от элемента [31].

ИК-спектр отражает электронное строение вещества, являясь специфической его характеристикой. Инфракрасная спектроскопия может быть использована сама по себе лишь по отношению к довольно чистым образцам, либо выделенным из биологической матрицы. Поэтому в токсикологическом анализе она используется для анализа образцов «вещественных доказательств» или как детектор газового или высокоэффективного жидкостного хроматографа [38]. В обоих вариантах метод трудоемок, требует дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала для эксплуатации.

1.2.1. Фотоэлектроколориметрия широко используется в повседневном анализе для количественного анализа, например, при определении гемоглобина и его производных, определении активности холинэстеразы, и др. При анализе некоторых токсических неокрашенных веществ используется переводение их с помощью химических реакций в окрашенные для визуализации. Измеряя интенсивность окраски получающегося раствора, можно судить о концентрации анализируемого вещества в растворе. Так определяют, например, производные 1,4-бензодиазепина по аминоксобо-бензофенонам [4].

1.2.2. УФ-спектроскопия аналогична предыдущему методу с той лишь разницей, что используется способность молекулы вещества поглощать в УФ-области спектра.

Широко известно использование дифференциальной УФ-спектрометрии при количественном анализе барбитуратов, основанное на сдвиге максимума поглощения при изменении pH раствора барбитурата [15, 43].

Возможна идентификация веществ, выделенных из биообразца хроматографическим или другим методом, по УФ-спектрам при сравнении их со спектрами стандартных образцов [35, 43]. Так, УФ-детектор один из самых распространенных при ВЭЖХ-анализе [5, 38].

Некоторые вещества обладают собственной флуоресценцией, которая также подчиняется законам светопоглощения/светоиспускания. В некоторых случаях изменение флуоресценции используют для визуализации результата, например, в ПФИА-методе. Иногда в вещество вводится так называемая «метка», вызывающая флуоресценцию, и таким образом регистрируется вещество или изменение его концентрации [8].

1.2.3. Масс-спектрометрия

Метод используется для детектирования веществ после ГХ или ВЭЖХ разделения компонентов анализируемой пробы. Молекула вещества в газообразном состоянии, попадая в масс-спектрометр, подвергается ионизации либо деструктивной под действием электронов высоких энергий, либо ассоциативной (химической) под действием специального газа. Фрагментация происходит по определенным правилам, отражая особенности структуры вещества. Получаемые ионы разделяются по массам и таким образом составляют спектр – специфическую характеристику вещества. При сравнении со спектрами стандартов можно идентифицировать вещество, а зная законы фрагментации-ионизации, даже предполагать структуру неизвестных веществ. Интенсивность масс-спектра зависит от энергии ионизации, но при прочих равных условиях пропорциональна количеству вещества в пробе. На практике масс-спектрометрию используют в настоящее время в основном в сочетании с разделительными хроматографическими методами [7, 43, 51 и др.].

1.3. Хроматографические методы

Хроматографический метод анализа разработан русским ученым М.С. Цветом в 1903 г. Развитие хроматографических методов началось в 30-е годы. Они бурно развиваются в настоящее время и являются одним из наиболее перспективных направлений анализа. Литературы по общим вопросам хроматографии очень много. Применению ее в химико-токсикологическом анализе посвящены многие руководства, основные из них – [7, 36, 43 и др.].

Хроматографию можно определить как процесс, основанный на многократном повторении актов сорбции и десорбции вещества при перемещении его в потоке подвижной фазы вдоль неподвижного сорбента.

1.3.1. Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Метод ТСХ в настоящее время широко применяется в аналитической токсикологии для скрининга лекарств в моче больных при острых отравлениях. В методе ТСХ неподвижная твердая фаза тонким слоем наносится на стеклянную, металлическую или полимерную пластинку, на стартовую линию наносят концентрированный экстракт мочи и метчики-вещества сравнения. Край пластинки погружают в систему растворителей, которая действует как подвижная фаза жидкостной адсорбционной хроматографии. Диффузия в тонком слое происходит в продольном и поперечном направлениях, поэтому процесс следует рассматривать как двухмерный.

Стационарная фаза представляет собой однородный слой толщиной 0,25 мм силикагеля (частицы размером 20 мкм). Пластинки для высокоэффективной ТСХ (ВЭТСХ) отличаются меньшим размером частиц (5–10 мкм) и поэтому обеспечивают более высокую чувствительность. Существуют пластинки для ТСХ с обращенной фазой, на которых гидрофобный агент (обычно углеродные радикалы C2, C8, C18) связан с силикагелевой матрицей. Однако пластинки ВЭТСХ и обращенно-фазные значительно дороже и позволяют анализировать меньшее количество образцов, и их не рекомендуется применять в рутинном анализе. Результаты ТСХ регистрируют в виде коэффициентов удерживания (R_f). R_f рассчитывается следующим образом:

$$R_f = \frac{\text{Расстояние, пройденное от старта анализируемым образцом}}{\text{Расстояние, пройденное от старта фронтом растворителя}}$$

Более удобным является показатель $R_f \times 100$ (hR_f), особенно если используется стандартная длина пластин 10 см, поскольку в этом случае величина hR_f равна расстоянию в миллиметрах, пройденному анализируемым веществом от старта. Существует много факторов, влияющих на воспроизводимость R_f . Однако их влияние может быть сведено к минимуму, если вместе с каждым образцом анализируются стандартные (эталонные) соединения.

Развитие аналитической ТСХ идет по пути повышения чувствительности и унификации процесса и условий хроматографии [43, 61–65]. Новым шагом в этом отношении является создание системы ToxiLab, DRG (США), обеспечивающей полную унификацию и стандартизацию процесса.

Использование готовых систем, пластин, камер, проявителей и идентификационных атласов гарантирует высокую воспроизводимость, надежность, исключает субъективный фактор, в т.ч. межлабораторный. ТСХ обычно применяется для качественного и полуколичественного определения.

1.3.2. Газовая хроматография (ГХ)

Подвижной фазой в ГХ является газ. В зависимости от состояния неподвижной фазы ГХ подразделяется на газо-адсорбционную, когда твердой фазой является твердый адсорбент, и газожидкостную, когда неподвижной фазой является жидкость, вернее, тонкая ее пленка на поверхности твердого носителя. В аналитической токсикологии используются разнообразные варианты газожидкостной хроматографии (ГЖХ).

Эффективность разделения в ГЖХ зависит, главным образом, от правильного выбора жидкой фазы. Она должна обладать достаточно высокой селективностью, быть химически инертной по отношению к анализируемым веществам, газу и твердому носителю, термически устойчивой и нелетучей. При выборе жидкой фазы следует руководствоваться правилом «подобное растворяется в подобном». При классификации их используется понятие полярности. Существуют таблицы, в которых содержатся данные по полярности различных неподвижных фаз. Среди неполярных наиболее употребимы – Апиезоны L, M, N, полисилоксаны SE-30, OV-17, OV-101 и т.д. Самыми распространенными полярными фазами являются Карбовакс 20М (полиэтиленгликоль с мол. весом 20000) и ХЕ-60 (цианоэтилсилоксан). К фазам средней полярности относятся OV-17 (фенилметилсилоксан). В качестве твердых носителей используются инертные вещества с развитой поверхностью, но малой пористостью, чтобы, по возможности, исключить адсорбцию газа на поверхности. Наибольшее распространение получили носители на основе кизельгура и диатомита. В аналитической токсикологии широко используются наполненные стеклянные и металлические колонки.

Существенно повышается эффективность разделения в капиллярной ГЖХ. При этом в качестве колонки используется капилляр с внутренним диаметром 0,1–0,5 мм и длиной несколько десятков метров. Жидкая фаза наносится на стенки капилляра, которые играют в данном случае роль твердого носителя. В капиллярной ГЖХ значительно уменьшается объем вводимой пробы, что требует специальных способов пробоподготовки и введения пробы (деление потока).

Детектирование столь малых количеств требует применения высокочувствительных детекторов. К детекторам низкой чувствительности относят все типы детекторов по теплопроводности (ДТП). Высокочувствительными считают пламенно-ионизационный (ДИП), термоионный (ДТИ), детектор по захвату электронов (ДЭЗ), масс-селективный (МС) и др. Широкий выбор детекторов позволяет решать самые разнообразные задачи, стоящие перед аналитической токсикологией. Характеристики различных детекторов приведены в таблице 2.

ГХ является методом качественного и количественного определения. Качественный состав пробы может быть установлен с использованием характеристик удерживания – абсолютное, исправленное, относительное времена удерживания, и индексов удерживания, которые рассчитывают, имея эталонные стандартные образцы аналогичных веществ.

Количественный газохроматографический анализ может быть проведен методами абсолютной калибровки (наиболее точный), внешнего или внутреннего стандарта, используя площади или высоты соответствующих хроматографических пиков.

1.3.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Как способ анализа сложных смесей ВЭЖХ появилась не более четверти века тому назад. Хроматографический процесс происходит между неподвижным твердым адсорбентом и подвижной жидкой фазой. В качестве адсорбентов используют модификации силикагеля. В качестве жидкой фазы используют органические растворители и буферные растворы в различных сочетаниях. В зависимости от сочетания этих двух факторов различают прямую и обращенно-фазовую жидкостную хроматографию. Детектирование основано на различных спектральных методах (УФ-, ИК-спектроскопия, флуоресценция и т.п.). Наиболее употребимым и доступным является сканирующий УФ-детектор.

Наиме
детектПламе
иониз
(FID)Катар
(TCD)Элект
захват
(ECD)Фото-
иониз
(PID)Термо
иониз
(NPD)По эл
прово
(ELCD)Пламе
фото
(FPD)Масс-
спект
(MSD)С исп
атом
спект
(AES)Озон
фото
люми

Таблица 2 Общие характеристики детекторов, используемых в газовой хроматографии

Наименование детектора	Тип	К каким веществам избирателен	Минимальный обнаруживаемый уровень	Ширина линейного динамического диапазона
Пламенно-ионизационный (FID)	Селективный	К веществам, ионизируемым в пламени водорода в воздухе	5 пг углерода/сек	10^7
Катарометр (TCD)	Универсальный	Любые, теплопроводность которых отличается от характерной для газа-носителя	400 пг/мл газа-носителя	10^6
Электронно-захватный (ECD)	Селективный	К электрофторам, находящимся в газовой фазе	0,1 пг хлора/сек (в зависимости от структуры)	10^4
Фото-ионизационный (PID)	Селективный	К веществам, ионизируемым ультрафиолетовым светом	2 пг углерода/сек	10^7
Термо-ионизационный (NPD)	Селективный	К соединениям азота, фосфора, к гетероциклам	0,4 пг азота/сек 0,2 пг фосфора/сек	10^4
По электропроводности (ELCD)	Селективный	К галогенам, соединениям азота и серы	0,5 пг хлора/сек 2 пг серы/сек 4 пг азота/сек	10^6 10^4 10^4
Пламенно-фотометрический (FPD)	Селективный	К соединениям фосфора и серы	20 пг серы/сек 0,9 пг фосфора/сек	10^6 10^4
Масс-спектрометрический (MSD)	Универсальный или специфичный	Подстройка под любой тип веществ	От 10 пг до 10 нг (в зависимости от настройки на специфические ионы при сканировании)	10^5
С использованием атомноэмиссионной спектроскопии (AES)	Универсальный или специфичный	Подстройка под любой элемент	От 0,1 пг до 1 нг (в зависимости от типа элемента)	10^3
Озоновый фотолюминесцентный	Селективный	К любым веществам, содержащим серу	0,1 – 1,0 пг/с серы	10^6

Не рассматривая основы теории ВЭЖХ, подробно изложенные в ряде монографий и статей [5, 38, 57], мы остановимся на вопросах использования ВЭЖХ в токсикологическом анализе.

Метод широко применяется во всех областях химии, в том числе в аналитической токсикологии, причем развитие метода в медицине шло по пути создания анализаторов. Более 10 лет назад фирмой Bio-Rad (США), были предложены автоматические анализаторы для ВЭЖХ определения трициклических антидепрессантов и бензодиазепинов, затем автоматическая система токсикологического анализа REMEDI для одновременного скрининга более 760 лекарственных препаратов, наркотиков и их метаболитов в моче и сыворотке крови (№ гос. регистрации 95/312 от 25.10.95 г.). Прибор оснащен встроенной системой пробоподготовки. Аналитический процесс и идентификация полностью автоматизированы, унифицированы, независимы от квалификации оператора. Время анализа 20 мин. Чувствительность определения до 100 нг/мл. Управление прибором простое, предусмотрена обширная самодиагностика [6, 23–26, 56, 58, 59].

Анализ включает удаление белков, изократическое разделение компонентов пробы, анализ спектральных данных, полученных со сканирующего УФ-детектора при двух длинах волн 205 и 235 нм. По окончании процесса компьютер анализирует данные и распечатывает результат на принтере. Компьютерная программа осуществляет прямой поиск, сравнивая относительные времена удерживания, главные максимумы спектра с каждой позицией базы данных, производит прямое сравнение спектров и рассчитывает фактор сходства. Все библиотечные позиции с близкими к этим параметрами неизвестного вещества в пределах граничных условий, составляют список кандидатов. Далее проводится обратный поиск, сравнивая нулевые значения второй производной спектра и второстепенные максимумы списка кандидатов с этими же параметрами неизвестного вещества. Кандидаты, удовлетворяющие этим критериям, остаются в списке кандидатов. Если в списке остается один кандидат, идентификация заканчивается. Если в списке остается более одного или ни одного кандидата, идентификация не производится. Однако аналитик может использовать компетентный список кандидатов для дальнейшего исследования

Распечатка результатов анализа включает значение высоты каждого пика в условных единицах. Это позволяет провести количественную оценку каждого компонента, используя факторы пересчета, сведения по разведению образца и высоты соответствующих хроматографических пиков.

2. Пробоподготовка

Стадия отбора, хранения и подготовки пробы имеет большое значение для объективности и чувствительности анализа. Неправильное осуществление ее может повлечь искажение результатов или потерю анализируемого вещества. Объем образца зависит от состояния больного и чувствительности используемого метода исследования.

Объектами исследования в аналитической токсикологии являются кровь (цельная, сыворотка или плазма) и моча. Для них характерно содержание анализируемых веществ и их метаболитов в довольно низких концентрациях и наличие большого количества «фоновых» эндогенных соединений. Такими фоновыми веществами могут быть небольшие количества пептидов, аминокислот, сахаров, стероидов, пигментов, их низкомолекулярных продуктов обмена. Целью пробоподготовки является максимально возможное удаление фоновых веществ и концентрирование определяемых. Способ ее зависит от природы объекта, анализируемого вещества и используемого метода анализа.

2.1. Парофазный анализ

Для анализа веществ с низкими температурами кипения, так называемых «летучих» токсикантов (в основном, органических растворителей), используется ГЖХ-анализ в парогазовой фазе. При этом в герметично закрытую пробу вводят внутренний стандарт, депротеинизирующие агенты (ТХУ, серная кислота и т.п.) и нагревают. На анализ отбирается газовая фаза. В случае спиртов их предварительно переводят в летучие эфиры – алкилнитриты, которые находятся в

газовой фазе при нормальной температуре, и анализируют методом ГЖХ [34]. Подробнее эти вопросы рассмотрены далее и в ряде публикаций [9, 11, 15, 37, 49].

Для анализа лекарственных, наркотических и других веществ хроматографическими методами обычно используется жидкость-жидкостная экстракция, концентрирование, твердофазная сорбция, перевод в производные или сочетание этих приемов.

2.2. Жидкостная экстракция

Жидкость-жидкостная экстракция остается на сегодняшний день самым распространенным приемом выделения лекарственных и наркотических средств из биообъектов. В основе лежит распределение вещества между двумя несмешивающимися жидкими фазами, которое зависит от природы исследуемого вещества, жидких фаз, значения рН, внешних факторов (температура, техника перемешивания и т.п.). Общепринято использование постадийной экстракции при кислых и щелочных значениях рН хлороформом, эфиром или другими подходящими растворителями, что приводит к разделению веществ на 2 большие группы «кислого, нейтрального» и «основного» характера. Полученные экстракты упаривают, растворяют в малом количестве органического растворителя и используют для анализа методами ТСХ, ГЖХ [7, 43, 36, 37]. Часто для ГЖХ, особенно для ГХ-МС используют образцы, которые дополнительно очищают хроматографически (ТСХ) [2].

2.3. Твердофазная экстракция

Этот подход состоит в адсорбции компонентов пробы на твердом сорбенте с последующим фракционным элюированием соответствующими растворителями или их смесями. По сути дела это вариант микроколоночной препаративной жидкостной хроматографии. В качестве сорбентов в зависимости от исследуемого вещества можно использовать нейтральные макропористые сорбенты типа Полисорб, ХАД [37], ионнообменные смолы [36], модифицированные силикагели с привитой фазой [41, 43, 44, 67]. В настоящее время многими фирмами в России и за рубежом налажен промышленный выпуск и поставка готовых «патронов» для твердофазной сорбции с подробной инструкцией по их использованию. Твердофазная сорбция обеспечивает лучшую очистку от фоновых веществ и концентрирование компонентов пробы, а при использовании коммерческих патронов дает выигрыш по времени и воспроизводимости. В дальнейшем элюаты упаривают и анализируют выбранным методом.

Для экспресс-методов, таких как иммунные и цветные реакции, не требуется сложная пробоподготовка. Зачастую она сводится к разбавлению образца или центрифугированию для удаления грубых частиц. При использовании автоматического анализатора REMEDI подготовка проб вне прибора: разбавление, центрифугирование, введение внутреннего стандарта. Реальная очистка пробы включена в аналитический процесс и подобна твердофазной сорбции [6, 23].

В некоторых частных случаях, например, когда с мочой выводятся вещества в виде эфиров (глюкуронидов), требуется гидролиз [4, 7, 43, 61, 63, 65]. Подробнее о пробоподготовке можно прочесть в статьях и разделах, относящихся к конкретным группам веществ.

3. Методики по отдельным группам токсичных веществ

3.1. Спирты, их суррогаты, промышленные хлорорганические продукты, технические жидкости

Основным наиболее специфичным, широко используемым методом определения растворителей и технических жидкостей в различных биологических объектах является газовая хроматография, позволяющая сочетать идентификацию и количественную оценку. Газохроматографические методы обладают ценными преимуществами, особенно для целей клинической токсикологии, – точностью, экспрессностью, простотой выполнения, универсальностью. В одной и той же пробе малого объема удастся определить сразу несколько соединений.

Официальным методом для анализа промышленных хлорорганических соединений и других летучих растворителей является метод парогазового анализа.

Для определения этанола и других алифатических спиртов используется пробоподготовка, с переводением в летучие соединения: для спиртов – алкилнитриты [34], для этиленгликоля – в фенилборонатный эфир [60]. Для извлечения нелетучих гликолей применяются специальные методики [1, 12].

В ряде работ используется прямой ввод депротеинизированных биопроб в хроматографическую колонку [3, 13]. В условиях работы лабораторий клинической токсикологии этот подход наиболее интересен, так как обеспечивает экспрессность анализа. Негативной стороной прямого ввода являются снижение чувствительности анализа, оседание сопутствующих веществ мочи и плазмы на колонках и устройствах ввода, спекание биологической пробы в игле при шприцевом вводе. Чтобы устранить эти недостатки применяются предколонки с адсорбентами или инжекторы с программированием температуры ввода.

Большинство методик определения летучих растворителей и гликолей предполагает детектирование по ионизации пламени (ДИП). При анализе спиртов C1–C5 в виде алкилнитритов используется детектор по теплопроводности – катарометр [34]. Для обнаружения следовых количеств хлорсодержащих соединений применяется детектор электронного захвата (ДЭЗ), селективный к хлору и другим галогенам [17]. Малые размеры молекулы четыреххлористого углерода обуславливают недостаточную чувствительность к нему ДИП. Поскольку отравления этим соединением происходят в основном ингаляционным путем и уровень концентраций в биожидкостях низок, необходимо использование ДЭЗ, селективного к хлору [17]. Используются как набивные, так и капиллярные хроматографические колонки [10, 11, 49].

При выборе неподвижной жидкой фазы руководствуются следующими принципами: определение ведут на 2-х колонках различной полярности; к анализируемым веществам неподвижные фазы подбираются соответствующей полярности [9, 11]. Учитывается также их доступность и экономичность. В основном это полиэтиленгликоли и их производные различной степени полимеризации и различных фирм-производителей – ПЭГ1500, ПЭГ6000, Карбовакс 20М, полиэтиленгликоль-адипинат, ПЭГ-сукцинат и т.п. Предложены и более полярные неподвижные фазы, например, 1,2,3-трис-2-цианэтоксипопан. Иногда сочетают нанесение 2-х жидких фаз в определенном соотношении для более тонкой градации степени полярности колонки. Не рекомендуется использовать неполярные фазы типа сквалана, апиезона, SE-30, OV-1, OV-101 и другие подобные.

В качестве твердого носителя для жидкой фазы используют различные пористые материалы: сополимеры стирола и дивинилбензола (Полисорб-1, Поропаки и др.); графитированная сажа – Карбопак; природные пористые материалы – кизельгур, хромосорб, инзенский кирпич. Главным требованием к ним является инертность по отношению к анализируемым веществам и жидкой фазе. Для повышения инертности можно использовать силанизированные или специально обработанные носители.

Возможно проведение газохроматографического анализа в режиме газоадсорбционной хроматографии. В качестве адсорбента используют рассмотренные выше неполярные или малополярные полимеры – Поропак Q, P, Сепарон BD, SDA, Полисорб-1, Тенакс, Хромосорб НР.

При анализе одного вещества или группы родственных соединений с близкими температурами кипения используют изотермический режим. Причем, если вещества хорошо летучи, температура ввода и колонки невысока. При анализе малолетучих соединений типа гликолей температура должна быть выше. Если в пробе находятся вещества, различные по физико-химическим параметрам, и стоит задача определения их всех, а также для улучшения разделения и хроматографического поведения анализируемых веществ и ускорения анализа рекомендуется программирование температуры.

Для экспертизы алкогольного опьянения используются пробы на алкоголь в выдыхаемом воздухе, основанные на окислении его перманганатом калия или хромовым ангидридом в при-

сутствии концентрированной серной кислоты. Результат оценивается по количеству восстановленного окислителя. Содержание алкоголя в крови рассчитывают через коэффициент пересчета. Метод не специфичен, т.к. окислению подвергаются другие спирты, другие вещества [28].

Для обнаружения спиртов предлагаются биохимические методы, основанные на ферментативном окислении спиртов алкогольдегидрогеназой. Регистрируется восстановленная форма НАД.Н₂, образованием которой сопровождается процесс окисления. В реакцию вступают и другие спирты, окисляемые алкоголь-дегидрогеназой. Использование иммуноферментного метода определения этанола в различном аппаратном оформлении (тест-полоски или стационарный анализатор), основанного на той же биохимической реакции, позволило достичь большей специфичности и чувствительности [47].

3.2. Лекарственные средства

3.2.1. Барбитураты

Производные барбитуровой кислоты – группа лекарственных веществ, оказывающих тормозящее действие на центральную нервную систему, используются в качестве успокоительных, снотворных, противосудорожных и средств для наркоза. Фармакологически барбитураты характеризуются быстрой всасываемостью из желудочно-кишечного тракта, причем натриевые соли всасываются быстрее, чем свободные кислоты. Разные барбитураты обладают различной продолжительностью действия, что связано с различной степенью связывания их с белками плазмы, скоростью метаболизма в организме и выделения из него. Щелочное значение рН мочи может усилить выведение фенобарбитала и барбитала. В таблице 3 приведены фармакокинетические параметры различных представителей этого класса [7, 20, 33].

Для скринингового определения барбитуратов используются иммунные методы, оценивающие общее содержание этих соединений (ИФА, РИА, ПФИА и т.д.). Они имеют отрицательное токсикологическое значение [7, 43, 47].

В рутинном химико-токсикологическом анализе применяется метод комплексного сочетания ТСХ и УФ-спектрофотометрии.

При проведении ТСХ исследуется кислый экстракт биожидкости. Кроме общих систем растворителей используются частные для барбитуратов: бензол-этилацетат (2 : 1), хлороформ-изопропанол-аммиак (5 : 5 : 1), а также некоторые другие [7, 15, 20, 36, 37]. Классический реагент для проявления – сульфат ртути в серной кислоте и дифенилкарбазон. Образующееся сине-фиолетовое окрашивание пятен, по R_f совпадающих со стандартами, свидетельствует о присутствии барбитуратов.

Количественное определение производных барбитуровой кислоты основано на измерении разности оптической плотности щелочного раствора барбитурата (в боратном буфере) при двух значениях рН среды: рН 13 и рН 10 при длине волны 260 нм [15, 37].

ГЖХ-определение производных барбитуровой кислоты проводится на жидких фазах типа SE-30 или OV-17, но обычно осложняется адсорбцией барбитуратов на твердом носителе. Для преодоления этого предлагается подвергать носитель кислотной инактивации, использовать носители градации ДА или проводить алкилирование барбитуратов. Используют ступенчатый температурный режим колонки 180° С, 200° С для барбитала, барбамила, нембутала, 230° С для фенобарбитала или другие варианты программирования. Испаритель работает при температуре 250° С. Детектор пламенно-ионизационный или азотно-фосфорный. Для подготовки пробы в образец вводили 0,25 М серную кислоту, столько же очищенного хлороформа, встряхивали, центрифугировали при 8000 об/мин. На анализ отбирали 1–5 мкл хлороформного извлечения [7, 20, 43].

ГХ-МС проводят в элюатах с ТСХ-пластин по нативным соединениям или их производным. Хроматографические условия общие, как для других лекарственных соединений [43, 45, 54].

Для анализа барбитуратов может быть использован метод ВЭЖХ. Используется колонка с обращенно-фазовым сорбентом типа С18. Подвижная фаза: смесь ацетонитрил-дистиллированная

Таблица 3. Фармакокинетические параметры барбитуратов

Название вещества	% связ. с белками	Метаболиты, % выведение вещества с мочой	Время полувыведения из плазмы, ч	Дозы		
				терапевтическая	токсическая	летальная
Фенобарбитал (длительного действия)	50-80	10-25% – неизменное вещество, 30% – глюкуронид, 17% – 4-гидроксипроизводное	24-140	4-12,3-26,2	3,5-13-27	4,3-45-120
Барбитал натрия (длительного действия)	5	70-90% в неизменном виде	70	540	20-80	> 90
Барбамил (среднего действия)	34-58	1% – неизменное вещество, 30- 50% 3-гидроксипроизводное, 30% N-глюкуронид	9-31	2-12	8,9-40-87,4	9,4-25,7-71,7
Этаминал-натрия (среднего действия)	45-70	1% – в неизменном виде, 37% – 3-гидрокси-, 13% – N-гидрокси-, 7-14% – 3-оксо-, 0-15% – 3-карбоксипроизводные	20-40	1,8-10	7,6-19,6-32,3	8,5-24,1-72,6
Циклобарбитал (среднего действия)	70	10% – неизменное вещество, основной метаболит – кетоциклобарбитал	8-75	2-10	8-30	> 20
Гексенал (короткого действия)	20	4%-неизменное вещество	4-15	1-5	8-20	50

вода (35 : 65) или 0,05 М водный двузамещенный фосфат аммония – метанол (60 : 40). Детектирование в УФ-свете при 220 нм или 240 нм. Подготовка пробы к анализу включает осаждение белков 40%-ной перхлоруксусной кислотой, центрифугирование и анализ депротеинизированной плазмы [20] или экстракцию хлороформом, смесью хлороформ-изопропанол или эфиром, упаривание и растворение в подвижной жидкой фазе [7].

3.2.2. Бензодиазепины

Бензодиазепины – группа транквилизаторов высокой активности с широким терапевтическим действием и относительно малой токсичностью. Она насчитывает около 100 наименований отечественных и импортных лекарственных препаратов, и каждый год пополняется за счет синтеза новых соединений подобной структуры. Относительная доступность делает их частой причиной злоупотребления и передозировок. Все они имеют сходную структуру 1,4-бензодиазепина с различными заместителями, при гидролизе дают бензофеноны, на чем и основывается их анализ.

Бензодиазепины легко всасываются из желудочно-кишечного тракта, максимальное количество в крови обнаруживается спустя 1–3 ч. Связывание с белками плазмы высокое (до 98% у диазепам). Депонируются в жировой ткани с последующим постепенным высвобождением в кровь, в связи с чем имеют довольно долгий период полувыведения (до 98 ч у диазепам). Выделяются преимущественно с мочой (свыше 60% дозы), остальная через пищеварительный тракт. Метаболизм производных бензодиазепина проходит в печени по реакциям окисления, деметилирования, дезаминирования, гидроксирования, восстановления и конъюгации с глюкуроновой кислотой. Часть первичных метаболитов обладает фармакологической активностью [7, 43, 29].

Экспресс-анализ бензодиазепинов проводят иммунными методами, оценивая общее содержание этих соединений (ИФА, РИА, ПФИА и т.д.) [7, 47].

Химический анализ бензодиазепинов проводится по двум направлениям: по продуктам окисления и гидролиза – бензофенонам и по нативным веществам и метаболитам. Первое направление [4, 15, 37, 67] обеспечивает оценку суммарного количества бензодиазепинов и метаболитов без разделения на индивидуальные вещества. Оно предусматривает кислотный гидролиз биообъекта (6 н HCl при 140° С в течение 60 мин), экстракцию образующихся аминокбензофенонов (рН 6–8, гептаном) и анализ экстрактов. Анализ проводят хроматографическими методами.

ТСХ проводят с подвижной фазой – бензолом. Обнаружение по собственной желтой окраске и флуоресценции в УФ-свете (при малых концентрациях по флуоресценции и реакции Браттона-Маршала). Предел обнаружения 1–5 мкг в пятне. Необработанную зону хроматограммы можно элюировать и снять электронный спектр и/или исследовать газохроматографически. Основные полосы поглощения аминокбензофенонов в спирте 230–240 и 390–400 нм. Количественное определение предложено проводить колориметрически по окрашенным продуктам реакции образования азокрасителя с бензофеноном [4].

Второе направление более сложное, но более информативное, позволяет обнаруживать индивидуальные вещества и их метаболиты. Оно включает экстракцию органическими растворителями при рН 6–8 или сорбцию бензодиазепинов из биообъекта и последующий анализ хроматографическими методами [27, 68].

Для ТСХ предложены общие системы и несколько частных, например, хлороформ-метанол 9 : 1, этилацетат-метанол-аммиак 85 : 10 : 5, метанол. Обнаружение можно проводить реагентами, дающими различное окрашивание. Эффективно проводить гидролиз на пластинке и обнаруживать по бензофенонам, но R_f будут, как у нативных веществ [4].

Для ГЖХ-обнаружения производных бензодиазепина используется общая система: неподвижная фаза типа SE-30 или OV-17, температура колонки 230° С (для феназепама и нитразепама 250° С), детектор пламенно-ионизационный или электроннозахватный. Возможны осложнения в анализе, связанные с термолабильностью бензодиазепинов и их водорастворимых метаболитов, которые решаются использованием реакционной хроматографии [7, 43, 67, 68].

ГХ-МС проводят в элюатах с ТСХ-пластин по нативным соединениям или их производными. Хроматографические условия общие, как для других лекарственных соединений [3, 41, 43].

Возможен ВЭЖХ-анализ производных бензодиазепина по нативным веществам или продуктам гидролиза. Используется колонка с обращенно-фазовым сорбентом типа C18. Подвижная фаза: смесь ацетонитрила – 0,05 М водного двузамещенного фосфата аммония 35 : 65 (для нативных) и 55 : 45 (для бензофенонов). Детектирование в УФ-свете при 230–220 нм [7, 43].

С 1997 г. фирмой Bio-Rad (США) предлагается специальный набор реагентов, колонок и программа определения бензодиазепинов в моче на стандартном ВЭЖХ-анализаторе REMEDI HS этой фирмы. Для определения в этой системе общей концентрации в набор входят реагенты для ферментного гидролиза глюкуронидов. Процесс проводится автоматически [56].

3.2.3. Фенотиазины

Группа лекарственных соединений, производных фенотиазина, используется как транквилизаторы, антидепрессанты, антигистаминные средства. Наиболее известные представители этой группы: аминазин (хлорпромазин), пропазин (промазин), левомепразин (тизерцин), метеразин (прохлорперазин), тиоридазин, хлорпротиксен, трифтазин и др.

Производные фенотиазина химически очень лабильны и подвергаются в организме активному метаболизму. Основные метаболитические реакции – сульфокисление, N-деметилование, гидроксирование, окисление и конъюгация с глюкуроновой кислотой [33, 43, 29].

Для экспресс-определения фенотиазинов в моче используют реакцию с FNP-реактивом, который состоит из смеси водных хлорида железа, перхлорной кислоты и азотной кислоты (1 : 9 : 10). Появляющаяся окраска от розового до сине-фиолетового цвета свидетельствует о возможном присутствии фенотиазинов или их метаболитов. Возможны ложные реакции – например, имипрамин (трициклический антидепрессант) дает зеленое окрашивание, а сонопакс не дает окраски [15, 29, 43].

Дальнейшие исследования осуществляют методами ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ, ГХ-МС. При подготовке проб мочи и крови к анализу проводят гидролиз или без гидролиза, затем извлечение смесью гептана с 3% изопентанола. Для ТСХ используют системы: бензол-диоксан-25%-ный аммиак (60 : 35 : 5) и этилацетат-ацетон-25%-ный аммиак в этаноле (50 : 45 : 4), или общие для основных веществ системы: толуол-ацетон-этанол-25%-ный аммиак (45 : 45 : 7,5 : 2,5) и диоксан-хлороформ-ацетон-25%-ный аммиак (47,5 : 45 : 5 : 2,5). Детектирование проводят опрыскиванием пластин этанольным раствором концентрированной серной кислоты или реактивом Марки. Все фенотиазины дают красное или темно-красное окрашивание кроме левомепразина, дающего голубой цвет. Количественное определение предлагается делать фотометрически по интенсивности окраски производного фенотиазина с метилоранжем [15, 35–37, 43].

Для ГЖХ-анализа используют тот же экстракт и следующие условия: неподвижная жидкая фаза типа SE-30 или OV-17, температура колонки – изотерма 230° С или программирование от 130 до 290° С, со скоростью 20 °/мин, температура испарителя 250° С. Детектор ДИП или азотно-фосфорный, или термоионный [7, 43].

Можно проводить анализ ГХ-МС в элюатах с ТСХ-пластин по нативным соединениям или по ацетилзамещенным производным. Хроматографические условия подобны указанным выше. Предпочтительно использование капиллярных колонок, которое повышает эффективность и чувствительность определения [43]. В масс-спектрах многих представителей этого класса базовым является пик 58 (56) или другой, соответствующий углеводородной цепи-заместителю в 10 положении. Ион 199, соответствующий трициклической фенотиазиновой структуре, обычно имеет слабую интенсивность.

Возможен ВЭЖХ-анализ производных фенотиазина в моче и сыворотке крови с использованием автоматического анализатора REMEDI HS фирмы Bio-Rad. Определяются активные концентрации самого вещества, а также соответствующего сульфоксида и некоторых других метаболитов. Чувствительность определения 0,1 мкг/мл [6, 23].

3.2.4. Трициклические антидепрессанты

К группе трициклических антидепрессантов относятся амитриптилин, имизин, их соответствующие N-дезметильные аналоги нортриптилин и дезипрамин. N-дезметильные соединения образуются как метаболиты при передозировке и отравлениях и обладают самостоятельной фармакологической активностью. Фармакологические и токсикологические параметры этих соединений представлены в таблице 4. Используются сведения из работ [7, 22, 33, 43, 66, 69].

В повседневном анализе химико-токсикологических лабораторий используется методика качественного обнаружения амитриптилина в моче методом ТСХ. Экстракция из мочи проводится в рамках скрининговых исследований при pH 10,5-11 хлороформом или эфиром. Упаренный экстракт наносят на пластинку и проводят хроматографирование в системах: этилацетат-ацетон-этанольный аммиак (50 : 45 : 5), бензол-диоксан-аммиак (60 : 35 : 5) или других подобных. Проявляют капельно концентрированной серной кислотой – оранжево-кирпичная окраска. Чувствительность 0,1 мкг в пятне [7, 32].

Количественное определение амитриптилина и нортриптилина проводят экстракционно-фотометрическим методом по комплексу с бромфеноловым синим после экстракционной и хроматографической очистки. Определяется сумма веществ. Чувствительность 1 мкг/мл, что рассчитано на определение фатальных, а не токсических концентраций [32].

Для экспресс-диагностики антидепрессантов в крови и моче используется иммунохимическая методика ЕМІТ. Метод качественный и полуколичественный. Легкий в исполнении, быстрый. Чувствительность 0,01 мкг/мл. Система ЕМІТ позволяет определять передозировку препаратов, что очень важно для тех лекарств, чьи терапевтические и токсические концентрации очень близки [47, 58].

Используется также ПФИА-анализатор фирмы Эббот. Фирма выпускает наборы для количественного определения суммы трициклических антидепрессантов. Чувствительность также 0,01 мкг/мл [43, 58].

Для дифференциальной диагностики изучения фармако- и токсикокинетики используются ГЖХ и ВЭЖХ.

Трициклические антидепрессанты определяются ГЖХ с ПИД в виде свободных оснований. Предел измерения 1 мкг/мл. Для определения токсических концентраций в крови требуется большая чувствительность, что достигается переводением веществ в трифторацетатные производные. Чувствительность 0,2 мкг/мл [22]. Могут быть использованы селективные детекторы – термоионный и масс-селективный, которые обеспечивают повышение чувствительности (до 0,1 мкг/мл) даже при анализе свободных оснований [7, 46].

В анализе трициклических антидепрессантов широко используется ВЭЖХ. Аппаратурно это может быть оформлено как хроматограф или автоматический анализатор [36, 58]. В рутинном анализе используется автоматический анализатор REMEDI HS фирмы Bio-Rad, который позволяет в скрининговом режиме определять многие антидепрессанты и их метаболиты с высокой разрешающей способностью (даже терапевтические уровни) [26, 58].

3.2.5. Антигистаминные препараты

К этой группе лекарственных средств относятся препараты, блокирующие H1-гистаминовые рецепторы, такие как димедрол, супрастин, тавегил, дипразин, диазолин и др. Наиболее типичным представителем является димедрол – дифенилгидрамин. Он довольно легко всасывается при приеме внутрь (биодоступность 50%), связывание с белками плазмы 72–98%, время полупребывания в крови 3–10 ч. Основные пути метаболизма: N-дезалкилирование, окислительное дезаминирование, конъюгация. Лишь 2–4% дозы выводится в неизмененном виде с мочой [29, 33, 43].

Таблица 4. Фармакокинетические параметры трициклических антидепрессантов

Название вещества	% связ. с белками	Метаболиты, % выведение вещества с мочой	Время полувыведения из плазмы, ч	Доза		
				терапевтическая	токсическая	летальная
Амитриптилин	86-98	Нортриптилин, N-оксид, 10,11-оксинортриптилин, 10,11-оксиамитриптилин 02,-5%	17-40	0,035-0,092- 0,202	0,046-0,168- 0,427 0,27-5,0	0,55-3,3-16,7
Нортриптилин	96	10,11-Оксинортриптилин, 0.8-5.0%	12-93	0,045-0,186- 0,253	0,5-0,8-1,2	100-10,78-13,26
Имизин	76-95	Дезимипрамин, 2-оксиимизин, 8-оксидезимипрамин, N-оксид, 1-3%	17-90	0,009-0,035- 0,126	0,1-0,41-3,2	0,85-4,52-13,1
Дезипрамин	70-98	8-Оксидезимипрамин, 2-оксидезимипрамин, 5%	14-60	0,011-0,032-0,11	0,40-1,5	3,8-10,0-16,8

Таблица 5. Фармакокинетические параметры сердечных гликозидов [29, 33, 43, 66, 69]

Название вещества	% связ. с белками	Метаболиты, % выведение вещества с мочой	Время полувыведения из плазмы, ч	Доза		
				терапевтическая	токсическая	летальная
Дигоксин	20-40	60-90	40-100	0,0004-0,0023	0,0014-0,0070	0,0015-0,0300
Ланатозид С	20-25	20-50	33-45	0,001-0,002	-	-
Дигитоксин	90-97	8-30	120-190	0,003-0,035	0,030	0,300

Анализ на дифенилгидрамин проводится после экстракции во фракции веществ основного характера. ТСХ проводят в общих системах, например, бензол-диоксан-аммиак (60 : 35 : 5), проявляют капельно концентрированной серной кислотой – лимонно-желтое окрашивание [15].

Для ГЖХ-анализа используют тот же экстракт и следующие условия: неподвижная жидкая фаза типа SE-30 или OV-17, температура колонки: изотерма 230° С или программирование от 130 до 290° С, при скорости нагрева 20 °/мин, температуре испарителя 250° С. Детектор ПИД или термоионный [7, 43].

3.2.6. Сердечные гликозиды

Дигоксин, дигитоксин и другие кардиотоксические гликозиды содержатся в растениях рода наперстянки и применяются как антиаритмические средства. Их фармакокинетические параметры приведены в таблице 5.

Эти соединения имеют высокую молекулярную массу, лабильны, уровни терапевтических и токсических концентраций очень низкие, в связи с чем определение их, особенно в биожидкостях организма, представляет определенные трудности. ВЭЖХ, ТСХ могут применяться для анализа сердечных гликозидов в сырье или остатках с места происхождения, но не в биожидкостях из-за недостаточной чувствительности. Для анализа гликозидов в моче используются иммунохимические методы. С этой целью успешно применяется ПФИА-анализатор фирмы Эббот.

3.3. Наркотические средства

3.3.1. Опиаты [7, 43, 44, 61, 65]

К опиатам относятся продукты, выделяемые из опийного мака (опий, соломка и др.), индивидуальные алкалоиды (морфин, кодеин, др.) и полусинтетические продукты на основе морфина (героин, дионин и др.) Морфин – основной алкалоид, обуславливающий наркотическое действие этих продуктов. Опий в зависимости от региона произрастания и способа приготовления содержит 4–21% морфина, соломка – около 5%. Морфин может быть различной степени очистки и, выделенный из растительного сырья, обязательно содержит примесь кодеина. Наиболее часто в последнее время употребляется героин – продукт ацетилирования морфина. В зависимости от исходного сырья и очистки героин может содержать наряду с диацетилморфином (ДАМ) – 30–90%, моно-ацетилморфин (МАМ) – 2–6%, ацетилкодеин 2–5%, наркотин, папаверин и др. Кроме того, «уличный героин» обычно содержит неопиоидные вещества – наполнители и модификаторы наркотического действия.

Попадая в организм, опиаты метаболизируются. Основной путь метаболизма для морфина – образование конъюгатов с глюкуроновой кислотой. Около 70% дозы выводится с мочой в виде глюкуронидов. 2–12% дозы выводится в виде свободного морфина, 1% – свободного норморфина и 3% – глюкуронида норморфина. За 8 ч выводится до 80% принятой дозы, за 24 ч – 60–90%, следы определяются в моче до 72 ч. Кодеин не может быть метаболитом морфина, и его обнаружение свидетельствует о присутствии его в исходном принятом средстве или о приеме самого кодеина. Тогда морфин является его метаболитом.

ДАМ имеет время полужизни в плазме 3–9 мин, превращаясь в 6- или 3-МАМ и далее в морфин. МАМ и морфин, в свою очередь, могут связываться с глюкуроновой кислотой и выводиться в таком виде. При выведении в моче обнаруживается от дозы: 0,05–0,5% ДАМ, 1–1,7% 6-МАМ, 50–60% морфина глюкуронида, 5–7% свободного морфина и 2,8–4% общего норморфина. Обнаружение в анализируемой пробе 6-МАМ вместе с морфином свидетельствует о приеме героина.

Все вышесказанное следует учитывать при проведении анализа образцов на наличие опиатов. Чтобы обнаружить общее количество морфина, кодеина, МАМ, для расщепления глюкуронидов следует проводить ферментный или кислотный гидролиз.

Кислотный гидролиз проводят концентрированной соляной кислотой на кипящей водяной бане 30 мин. После охлаждения добавляют 1,5 М карбонатный буфер и 0,1 М гидроксид натрия (итоговая рН 9-9,5).

Экстракцию проводят смесью растворителей: хлороформ-изопропанол 9 : 1 или 3 : 1, или хлороформ-бутанол 9 : 1, метиленхлорид-изопропанол 7 : 3, для героина – этилацетат. ВОЗ рекомендована система толуол-гептан-изоамиловый спирт 7 : 2 : 1. Возможно использование патронов для твердофазной экстракции типа Bound Elut с фазой C18. Для обработки плазмы и сыворотки предлагается высаливание насыщением сульфатом натрия или карбонатом калия с последующей экстракцией эфиром.

Анализ методом ТСХ проводят в системах :

а) толуол-ацетон-этанол-аммиак 45 : 45 : 7 : 3; R_f морфина 19, кодеина 40;

б) этилацетат-метанол-аммиак 85 : 10 : 5; R_f морфина 20, кодеина 35.

Проявление пластинок осуществляют реактивом Драгендорфа – неизбирательно окрашиваются соединения с третичным азотом, или реактивом Марки, который наносят капельно в зону пятна. Опиаты дают черное или фиолетовое окрашивание.

Опиаты можно определять методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Предлагаются два режима. 1) Колонка прямофазная типа Лихросорб. Подвижная фаза ацетонитрил-метанол (75:25) с добавлением 0,04 частей раствора концентрированный аммиак-метанол (1:2) и 0,216 частей раствора ледяная уксусная кислота-метанол (1:1). Скорость подвижной фазы 1,3 мл/мин. Детектирование УФ при 218 нм [7]. 2) Колонка обращенно-фазная C18. Подвижная фаза – ацетонитрил – буфер (0,2М перхлорат натрия с 0,005 М цитрат натрия) 1:9. Скорость подвижной фазы 1,9 мл/мин. Детектирование электрохимическое [65].

Все вещества опийной группы – морфин, кодеин, диацетилморфин, моноацетилморфин и т.д. и их метаболиты одновременно с хорошей надежностью определяются в автоматической системе REMEDI HS [6, 23-25, 59].

Возможен анализ ГЖХ с ПИД. Среди наполненных колонок используются в основном колонки с неполярными неподвижными фазами SE-30, OV-1, OV-17. Температура колонки 230° С, инжектора и детектора 275° С. Газ-носитель – азот 70 мл/мин [7, 43, 53]. Для капиллярных колонок условия очень различны. Перед ГЖХ-анализом обязательно проводят в производные для улучшения хроматографических свойств анализируемых веществ.

Часто при анализе используется сочетание ГЖХ с масс-селективным детектированием. Хроматографические условия остаются прежними или изменяются, часто используется программирование температуры колонки. Масс-спектры получают при сканировании масс 50–500 абс. ед. массы при регистрации избранных ионов, ионизации электронным ударом [7, 42–44, 51, 52, 61, 65].

При скрининге биожидкостей на наличие опиатов используются иммунные методы. Они не требуют предварительного гидролиза, т.к. с их помощью определяются и свободные морфин, кодеин и т.д., и их конъюгаты с глюкуроновой кислотой. Определяется сумма опиатов из-за групповой специфичности метода [7, 47, 70].

3.3.2. Каннабиноиды [7, 63, 43]

В эту группу наркотических средств входят препараты из различных частей конопли. Наиболее распространенные – марихуана, гашиш, гашишное масло и др., отличающиеся друг от друга степенью очистки, количеством и качественным составом алкалоидов. Основной компонент, обладающий наркотическим действием – Δ^9 -тетрагидроканнабинол (Δ^9 -ТГК). Уровень Δ^9 -ТГК в марихуане 0,5–5%, в гашише 2–10%, в гашишном масле 10–30%.

При курении каннабиноиды быстро всасываются, причем повышается содержание активных компонентов – Δ^9 -ТГК и каннабинола. Уровень их в крови быстро повышается и затем снижается из-за активного метаболизма и частичного депонирования печенью и другими тканями. При пероральном введении всасывание замедлено, и максимум концентрации в крови наблюдается

через 2–3 ч. Степень абсорбции Δ^9 -ТГК при курении и пероральном введении индивидуальна и составляет соответственно 2–56 и 6–20%.

Метаболизм происходит в основном в печени и достаточно активно. Первичный метаболит – 11-гидрокси Δ^9 -ТГК – более активен, чем исходное вещество. Также активен 8b-гидрокси Δ^9 -ТГК. Основным неактивным метаболитом – 11-норкарбокسي- Δ^9 -ТГК(Δ^9 -ТГК-кислота) и ее глюкурониды.

Для Δ^9 -ТГК примерно 80–90% дозы выводится за 5 дней, причем около 20% с мочой и остальное с калом. С мочой каннабиноиды выводятся в виде метаболитов, основным из которых является Δ^9 -ТГК-кислота, на 80% связанная с глюкуроновой и серной кислотами.

Анализ каннабиноидов представляет определенные трудности вследствие их высокой липорастворимости и низких концентраций в исследуемых биожидкостях – крови и моче. Поэтому часто употребление доказывается обнаружением их в смывах рук и полости рта курильщиков [7, 14].

ТСХ используется обычно для анализа спиртовых смывов рук и полости рта. Каннабиноиды экстрагируют этилацетатом, гексаном или петролейным эфиром. Экстракт упаривают и используют для цветных экспресс-реакций и для ТСХ анализа. Хроматографию в системе петролейный эфир-диэтиловый эфир (4 : 1) проводят двукратно. Для обнаружения опрыскивают пластинку 0,5%-ным раствором Прочного синего Б или ББ в 10% карбоната натрия. R_f каннабинола – 0,76, Δ^9 -ТГК – 0,84. Цветной тест может быть использован для смывов и образца вещества. Образец помещают в пробирку, смешивают с реактивом, состоящим из соли Прочного синего Б с сульфитом натрия, добавляют 25 капель хлороформа, а затем 25 капель 0,1 М раствора гидроксида натрия. Пурпурно-красное окрашивание хлороформного слоя указывает на положительный результат.

Наиболее простым и чувствительным методом обнаружения каннабиноидов в биожидкостях являются иммунохимические методы, которые детектируют и свободный Δ^9 -ТГК, и метаболиты. У хронических наркоманов в моче иммуноферментным методом определяется более 20 нг/мл в течение месяца, а у «легких» потребителей – в среднем 13 дней [7, 47, 63, 70].

Как подтверждающие используют более селективные методы (ГЖХ, ГХ-МС). При подготовки пробы мочи к анализу этими методами необходимо проводить щелочной гидролиз конъюгатов Δ^9 -ТГК-кислоты. Образующуюся Δ^9 -ТГК-кислоту экстрагируют и после упаривания растворителя переводят в метиловый эфир. ГХ-анализ осуществляют в виде эфира. Характерные масс-фрагменты для метилового эфира Δ^9 -ТГК-кислоты m/z 372, 357, 313.

При анализе плазмы крови гидролиз не проводят – в остальном анализ проводится так же. Определяется как Δ^9 -ТГК-кислота, так и Δ^9 -ТГК. Характерные масс-фрагменты для Δ^9 -ТГК m/z 314, 299, для метил- Δ^9 -ТГК m/z 328, 313 [63, 51, 44].

3.3.3. Кокаин [7, 29, 43, 62]

Кокаин – алкалоид, получаемый из сухих листьев растений рода *Erythroxylon* или синтетически из экгоина. Гидрохлорид кокаина – эффективный местный анестетик. Системно оказывает возбуждающее стимулирующее действие. Минимальная летальная доза для взрослых составляет 1–2 г, наркоманы могут переносить большие дозы.

Злоупотребление происходит путем инъекций или ингаляций, пероральный прием оказывает более слабое действие за счет гидролиза в желудочно-кишечном тракте. Кокаин в виде свободного основания (крек) быстро адсорбируется через слизистые при вдыхании или курении.

Основные метаболиты кокаина – бензоилэкогонин, экогонин и его метиловый эфир – неактивны, норкокаин – активный метаболит образуется в малых количествах и неустойчив, другие метаболиты – метилэкогонил, этилэкогонин, гидроксикокаин. С мочой выводится примерно 1–9% внутривенной дозы в виде кокаина, 35–55% в виде бензоилэкогонина. Уменьшение pH мочи способствует выведению нативного вещества. Объем распределения кокаина – 1–3 л/кг, клиренс – 10–30 мл/мин/кг, период полувыведения – 0,7–1,5 ч. Кокаин продолжает активно метаболизироваться в отобранной пробе мочи, поэтому в пробу для анализа добавляют консервант – фторид натрия. Обнаружение метаболитов кокаина указывает на употребление кокаина.

Для скринингового анализа на кокаин (бензоилэкгонин) используют иммунные методы [62, 7, 47, 70], ТСХ [7, 43, 57, 62], автоматизированный ВЭЖХ анализатор (REMEDI) [59, 6, 23]. Подтверждающие методы: ГЖХ, ГХ-МС [7, 43, 62, 44].

Экстракцию из мочи проводят при рН 9-10. ГХ-анализ проводят по нативным веществам или метиловым эфирам. Характерные масс-фрагменты для кокаина и метилэкгонина: m/z 303, 182, 82, для бензоилэкгонина: m/z 421, 300.

3.3.4. Фенилалкиламины [64, 7, 43, 44]

Фенилалкиламины – стимуляторы нервной системы, симпатомиметики. К ним относятся эфедрин, эфедрон, метамфетамин, амфетамин и др. Длительность действия их примерно 4-6 ч. Все вещества этой группы быстро всасываются в желудочно-кишечном тракте после перорального введения. Максимальная концентрация в крови через 2 ч. Выводится с мочой за сутки 70-90% вещества.

Значение рН влияет на метаболизм и период полувыведения из плазмы. Кислые значения способствуют выведению вещества в нативном состоянии, период полувыведения удлиняется. При щелочном значении рН увеличивается доля метаболитов, а время полувыведения снижается.

Эфедрон выделяется на 20-30% в неизмененном виде в течение 12-16 ч, 50-60% в виде основного метаболита – эфедрина, который обнаруживается в моче до 36 ч после приема, остальные метаболиты – норэфедрин и другие не установленного строения. Эфедрин в неизмененном виде выделяется на 55-75%, основные метаболиты: 8-20% норэфедрин, 4-13% бензойная и гиппуровая кислоты, фенилпропандиол. При щелочном значении рН выведение нативного эфедрина снижается до 20-35%, но увеличивается выведение метаболита – норэфедрина.

При употреблении норэфедрина он выводится практически полностью неизмененным. В качестве метаболитов могут присутствовать небольшие количества амфетамина, эфедрина. Метамфетамин выводится на 45% в неизмененном виде, 5% – в виде амфетамина, 15% – 4-гидро-ксиметиламфетамина.

Амфетамин – экскретируется с мочой на 30% неизмененным. Метаболиты: 16-28% – гиппуровая кислота, 4% – бензоглюкуронид, 2-4% – 4-гидроксиамфетамин, 2% – норэфедрин. Таким образом, обнаружение в моче этих метаболитов может свидетельствовать о приеме соответствующих наркотиков группы фенилалкиламина.

Для обнаружения фенилалкиламинов в биожидкостях используются иммунные методы (групповая специфичность) [47, 64, 70], ТСХ [2, 7, 64], ВЭЖХ [7, 64], ГЖХ [7, 64], ГХ-МС (индивидуальное обнаружение) [2, 48].

Выделение из мочи осуществляют при рН 11 бензолом. После обезвоживания к экстракту добавляется 5%-ный метанольный раствор HCl, т.к. вещества данной группы в виде оснований летучи и/или легко окисляются. Раствор упаривают. Остаток растворяют в этаноле.

Для целенаправленного ТСХ-исследования используют системы: метанол-аммиак (49 : 1), бензол-диэтиламин-этанол (9 : 1 : 1). Значения R_f в последней системе: эфедрон 0,65, эфедрин 0,41, первитин 0,42.

Для ГЖХ-анализа используют различные методики: с переводом в производные и без, в изотермическом режиме или с программированием температуры. В качестве детектора можно использовать ПИД, азотно-фосфорный, МСД [7, 43, 64].

Одна из предлагаемых методик: Колонка стеклянная, насадочная силанизированная 1 м x 3 мм. Сорбент 10% Карбовакс 1500 на инертоне AW-HMDS. Температура испарителя и детектора 200°С, температура колонки от 130° до 200°С, 15°/мин, конечная температура 12 минут или изотерма 170°С для эфедрона, эфедрина, норэфедрина, и 130°С – для амфетамина и метамфетамина. Предел обнаружения от 0,08 мкг/мл для метамфетамина до 0,50 мкг/мл для эфедрина при анализе 10 мл мочи.

Анализ фенилалкиламинов методом ГХ-МС осложняется тем, что они плохо разделяются и имеют сходные масс-спектры. Поэтому рекомендуется проводить перевод в производные и анализировать в виде пентафторпропионатов, трифторацетатов и др. [2, 44, 48, 51, 64].

ВЭЖХ-анализ предпочтительно проводить на колонках с обращенной фазой типа C18 – Лихросфер, Партисил, Силасорб, Бондапак. В качестве подвижной фазы используют различные смеси растворителей, но обычно применяют сочетание метанол или ацетонитрил-вода-фосфатный буфер. Детектор – УФ-фотометр для нативных соединений, реже хемилюминисцентный или флуоресцентный для соответствующих производных [7, 43, 64].

На автоматическом ВЭЖХ-анализаторе REMEDI легко определяются основные представители группы фенилалкиламинов и их метаболиты [6, 23, 25, 59].

3.4. Тяжелые металлы

Определение токсичных металлов и их соединений органической природы включает 2 этапа: перевод металла из связанного с органическим веществом состояния и непосредственно анализ. Первый этап – минерализация – для большинства металлов осуществляется путем нагревания биообъекта со смесями концентрированных кислот – азотной, серной, хлорной или с пергидролем, т.н. «влажное озоление». Для ртути проводится деструкция концентрированными серной и азотной кислотами в присутствии этанола без полного разрушения органических веществ [31]. Дальнейшее исследование раньше проводили ступенчатой системой химических реакций [13], но этот метод длителен, трудоемок, требует довольно больших объемов биожидкостей и плохо приспособлен для целей клинической токсикологии.

В настоящее время должен использоваться более современный экспрессный метод атомно-адсорбционной спектрофотометрии, позволяющий проводить как качественный, так и количественный анализ металлов в исследуемых образцах. Озоленная проба распыляется в высокотемпературном пламени горелки, и снимается ее спектр поглощения. Каждый металл имеет свою характерную длину волны поглощения. Интенсивность поглощения коррелирует с концентрацией данного элемента в образце. Для определения ртути используется генератор гидридных паров, соединенный со спектрофотометром [32].

Диагностику отравлений метгемоглобинообразующими ядами проводят не по самим веществам, а по клиническому показателю – метгемоглобину в крови [39].

3.5. ФОС

Для определения фосфорорганических соединений (ФОС) в крови (сыворотке, плазме), моче, промывных водах, перитональной жидкости разработана скрининговая система газохроматографического анализа с селективным термоионным детектором [16]. Высокая селективность детектора к ФОС и малая его чувствительность к соединениям, содержащим азот, позволяют свести очистку экстрактов из биологических объектов до минимума и полностью устранить трудоемкую операцию. Минимально детектируемое количество (в расчете по метафосу) составляет 0,01 мкг/мл. Линейный динамический диапазон термоионного детектора составляет 10^{-4} от предела детектирования.

Разработанная система анализа включает изолирование ФОС из биосред *n*-гексаном, концентрирование и последующее исследование экстрактов на газовом хроматографе, используя известный прием идентификации на двух колонках с неподвижными жидкими фазами различной селективности: ХЕ-60 и SE-30. Качественный анализ проводят с использованием различий относительного времени удерживания ФОС, количественный анализ – методом внешнего стандарта.

В дифференциальной диагностике отравлений делают упор на анализ неизмененного соединения, то есть выявляют тот потенциальный резерв, который вызывает токсический эффект. Поскольку ФОС в промышленности производят в виде технических продуктов, то при дифференциальной диагностике острых отравлений нужно определять не только нативные соединения, но и их технологические примеси.

Отравления ФОС сопровождаются ингибированием холинэстеразы (ХЭ), поэтому важным косвенным показателем при отравлениях является определение активности холинэстеразы (АХЭ) цельной крови, плазмы, эритроцитов. Наиболее часто используются потенциметрические, фотокolorиметрические методы. Метод Хестрина в модификации Эйдельмана [40] основан на colorиметрии комплекса трехвалентного железа с ацетилгидроксамовой кислотой – продуктом реакции ацетилхолина с гидроксиламином. Нормальная АХЭ цельной крови составляет 1,92–2,6 мкмоль. В практической работе удобнее пользоваться процентным выражением содержания АХЭ у больного к норме. При тяжелых отравлениях ФОС АХЭ цельной крови снижается до 5–10% от нормы. В легких случаях снижение менее заметно. Первые симптомы интоксикации проявляются при снижении АХЭ более чем на 30%. Следует, однако, учитывать индивидуальные колебания ($\pm 30\%$) нормальной активности ХЭ цельной крови у людей, что значительно затрудняет диагностическую интерпретацию полученных данных.

4. Эффективность использования методов

Эффективность предлагаемых методов химико-токсикологического анализа обеспечивается сочетанием чувствительности, селективности и экспрессности используемых методик.

Чувствительность (пределы обнаружения) анализа различными методами по группам веществ приведены ниже в приложении 1.

Экспрессность предлагаемых методик от 5 до 60 мин при качественном обнаружении и до 180 мин (ГЖХ) – при количественном определении.

Список литературы

1. Гуляева Т.Н. Химико-токсикологическое исследование этиленгликоля. Дисс. канд. фарм. наук. СПб, 1994.
2. Веселовская Н.В. Анализ метилendiокси-производных амфетамина хроматографическими методами // Суд.-мед.экспертиза, 1999. – № 1. – С. 14-19.
3. Веселовская Н.В., Уфимцева Е.В., Белова М.В., Изотов Б.Н. Определение диазепама в моче и плазме методом хромато-масс-спектрометрии // Вопросы наркологии, 1994. – №3. – С. 53-58.
4. Волкова И.Е. Определение хлордиазэпоксида и его метаболитов в трупном материале. Метод. рекомендации, М., 1988.
5. ВЭЖХ в биохимии. П/ред. А.Хеншен. М.: Мир, 1988. – 303 с.
6. Дагаев В.Н., Лисовик Ж.А., Кобзева Н.В., Грачева И.О., Ключев А.Е. Диагностическая система анализа лекарственных препаратов REMEDI в аналитической и клинической токсикологии // Токсикологический вестник, 1995. – №3. – С. 37.
7. Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. Анализ наркотических средств. М.: Мысль, 1993. – 268 с.
8. Ермаков А.Н. Разработка полярографического флюороиммунного анализа фенobarбитала и барбитала в моче. Автореф. дисс. к. фарм. н. М., 1994. – 24 с.
9. Ключев А.Е., Белова М.В., Изотов Б.Н., Лужников Е.А. Количественное определение технических жидкостей в дифференциальной диагностике острых отравлений // Токсикологический вестник, 1997. № 5. – С. 16-21.
10. Краснова Р.Р., Яновский С.М. Газохроматографический анализ летучих веществ с использованием малогабаритного газового хроматографа МХП // Суд.-мед. экспертиза, 1998. – № 1. – С. 18-24.
11. Ключев А.Е., Лисовик Ж.А., Белова М.В., Колдаев А.А. Анализ суррогатов и водок при острых химических отравлениях с использованием капиллярной колонки // Сб.: Тез. докладов Первой научно-практической конференции и выставки «Идентификация качества и безопасность алкогольной продукции» Пущино, 1999. – С. 141.
12. Кохановский Ф.А., Бубон В.С. Газохроматографическое определение этиленгликоля в моче живых лиц и трупов // Суд.-мед.экспертиза, 1983. № 2. – С. 46-48.
13. Крылова А.Н. Исследование биологического материала на «металлические яды» дробным методом. М., 1975. – 100 с.
14. Кузьмин Н.М., Семкин Е.П. Методика ВНИИ МВД СССР, 1984.

15. Лабораторная диагностика острых отравлений. П/ред. Рукозенова Э.Д., М.: Воениздат, 1983. – 115 с.
16. Лисовик Ж.А. Газохроматографическое определение в крови, перитонеальной жидкости и промывных водах желудка метафоса, метилнитрофоса, трихлорметафоса-3, тролена и карбофоса. Методические рекомендации. М., 1980.
17. Лисовик Ж.А. Газовая хроматография в клинической токсикологии // В кн.: Прикладная хроматография. М., 1984. – С. 221-227.
18. Лисовик Ж.А., Чуркина Л.В. Экспресс-диагностика острых отравлений химической этиологии // В сб.: Диагностика, клиника и лечение критических состояний при острых отравлениях и эндотоксикозах. М., 1988. – С. 129-133.
19. Лисовик Ж.А., Чуркина Л.В. Особенности лабораторной диагностики лекарственных препаратов и других токсических веществ при эндотоксикозах // В сб.: Биологические проблемы острых интоксикационных психозов. М., 1989. – С. 26-31.
20. Лисовик Ж.А., Чуркина Л.В. Хроматографическое определение барбитуратов в биологических объектах. Практика хроматографического анализа, М., ИРЕА, 1992. – С. 81-86.
21. Лисовик Ж.А. Лабораторно-химический контроль при лекарственных отравлениях // В сб.: Острые отравления лекарственными веществами. М., 1992. – С. 64-72.
22. Лисовик Ж.А. Трициклические антидепрессанты и их химико-диагностическая характеристика // Там же, С. 112-116.
23. Лисовик Ж.А., Симанов А.Л., Ключев А.Е. Система лекарственного мониторинга REMEDI для экстренной клинической токсикологии // В сб.: II Международный симпозиум «Хроматография и спектроскопия в анализе объектов окружающей среды», СПб., 1996.
24. Лисовик Ж.А., Белова М.В. Анализ лекарственных, наркотических средств и их метаболитов в сыворотке крови и моче больных // 1-й Съезд токсикологов России, М., 1998. – С. 180.
25. Лисовик Ж.А., Белова М.В., Петров С.И. Особенности химико-токсикологического анализа при острых отравлениях наркотиками // В сб.: Особенности клиники, диагностики и лечения острых отравлений наркотиками. М., 1999. – С. 38-41.
26. Лисовик Ж.А., Белова М.В., Кочеткова Е.А. Усовершенствованная методика для мониторинга трициклических антидепрессантов и их метаболитов в сыворотке крови больных // В сб.: Актуальные вопросы клинической и экспериментальной фармакологии, СПб, 1999. – С. 125.
27. Лощинин А.Н. Газохроматографический анализ производных 1,4-бензодиазепина в биологических жидкостях. Автореф. дисс. к. фарм. н. М., 1980.
28. Медицинское освидетельствование лиц для установления факта употребления алкоголя и состояния опьянения. Метод. указания. М., 1988. – 40 с.
29. Основы аналитической токсикологии. Р.Дж.Фланаган, и соавт. ВОЗ, Женева, 1997.
30. Петров С.И., Белова М.В., Лисовик Ж.А., Ключев А.Е., Кочетков И.Ю. Оценка применения гипохлорита натрия при острых отравлениях лепонексом и амитриптилином // В сб.: Шестой Всероссийский съезд реаниматологов и анестезиологов. М., 1998. – С. 198.
31. Назаров Г.Н., Макаренко Т.Ф. Методы спектрального анализа в судебной медицине. М., 1994. – 360 с.
32. Николаева Э.Г. Амитриптилин в химико-токсикологическом отношении. Автореф. дисс. к. фарм. н., М., 1979. – 23 с.
33. Селезнев Е.Ф. Количественная оценка некоторых кинетических параметров лекарственных веществ у людей // Фармация, 1987. – № 3. – С. 79-83.
34. Система газо-хроматографического исследования биологических проб на наличие алкоголя и суррогатов. Метод. рекомендации. М., 1985. – 18 с.
35. Соломатин Е.М. Химико-токсикологическое изучение психотропных препаратов фенотиазинового ряда. Дисс. докт. фарм. н. М., 1990.
36. Хроматография. Практическое применение метода. т.2. П/ред. Э.Хефтман. М.: Мир, 1986. – 422 с.
37. Химико-токсикологический анализ веществ, вызывающих одурманивание. Методические указания. П/ред. Б.Н.Изотова. М., 1989. – 122 с.
38. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига, 1988. – 390 с.
39. Шепелев В.М., Морозов В.С., Колдаев А.А., Лисовик Ж.А. Лабораторные методы анализа // В кн.: 1 Всероссийск. конф. по клин. токсикологии. М., 1968. – С. 44-46.
40. Эйдельман М.И. Определение активности холинэстеразы в цельной крови // Лаб. дело, 1963. – № 10.

41. Black D.A., Clark G.D., Haver V.M., Garbin J.A., Saxon A.J. Analysis of Urinary Benzodiazepines Using Solid-phase Extraction and GC/MS // *J. Anal. Toxicol.*, 1994. – V. 18. – P. 185-188.
42. Braithwaite R. A Suicidal Overdose with Long Acting Morphine // *Bullet. of TIAFT*, 1994. – V. 24. – № 1. – P. 31-34.
43. Clark E.G.C. Isolation and identification of Drugs. London, 1975. – Vol. 1,2.
44. Critical Issues in Urinalysis of Abused Substances: Report of the Substance-abuse Testing Committee // *Clin.Chem.*, 1988. – V. 34. – № 3. – P. 605-632.
45. Identification and Differentiation of Barbiturates, other Sedative-Hypnotics and Their Metabolites in urine Integrated in a General screening procedure using Computer GC/MS // *J. Chrom. B, Biomed.Appl.*, 1990. – P. 307-326.
46. Dettling R.J., Briglia E.J., Dal Cortivo L.A., Bidanset J.H. The Production of Amitriptyline from Nortriptyline in Formaldehyde-Containing Solutions // *J. Anal. Toxicol.*, 1990. – V. 14. – P. 325-326.
47. EMIT st (Syva) Urine Assays for Drugs of Abuse. Syva laboratories, 1991.
48. Kraemer T., Maurer H.H. Determination of Methamphetamine, Amphetamine and Amphetamine-Derived Drugs or Medicaments in Blood and Urine // *J. Chrom.-B.*, 1998. – V. 713. – P. 163-187.
49. Levesey J.F., Perkins S.L. et al. Simultaneous determination of alcohols and ethylene glycols in serum by packed or capillary column GC // *Clin. Chem.*, 1995. – V. 41. – № 2. – P. 300-305/
50. Lehmann T., Breinmeisen R. HPLC Profiling of Cannabis products // *J. Liquid Chrom.*, 1995. – V. 18. – P. 689-700.
51. Maurer H.H. Systematic Toxicological Analysis of Drugs and Their Metabolites by GC/MS // *J. Chrom. Biomed. Appl.*, 1992. – V. 118. – P. 3-41.
52. Moeller M.R., Steinmeyer S., Kraemer T. Determination of Drugs of Abuse in Blood // *J. Chrom.-B.*, 1998. – V. 713. – P. 91-109.
53. Malhotra R., Ming Wang. Fatal Ingestion of Opiates // *Bulletin of TIAFT*, 1994. – V. 25. – № 2. – P. 33-34/
54. Mule S.J., Casella G.A. Confirmation and Quantification of Barbiturates in Human Urine By GC/MS // *J. Anal. Toxicol.*, 1989. – V. 13. – P. 13-16.
55. Edlund P.O., Paalsow L.K. Quantitative gas-liquid chromatographic determination of Clonidine in plasma // *Acta Pharmacol et Toxicol.*, 1977. – V. 40. – № 1. – P. 145-152.
56. Orsulak P.V., Akers, Barber Evaluation of the Bio-Rad Urine Benzodiazepines by REMEDI HS // In: 5th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Vancouver, Canada, 1997.
57. Parker M., Shropshire D., Green J. Evaluation of liquid chromatography system as an alternative to thin-layer chromatography in comprehensive drug testing // *Clin. Chem.*, 1995. – V. 41. – P. 128.
58. Pesce M.A., Alrazi J. Comparison of the triage immunoassay and REMEDI HPLC systems for detection of tricyclic antidepressant drugs in urine // *Clin. Chem.*, 1994. – V. 40. – № 6. – P. 1077.
59. Pesce M.A., Housey G.M., Alrazi J. Comparison of the triage immunoassay and REMEDI HPLC systems for drugs of abuse testing in urine // *Clin. Chem.*, 1994. – V. 40. – № 6. – P. 1077.
60. Porter W.H. Gas-chromatographic determination of ethylene glycol in serum // *Clin. Chem.*, 1982. – V. 28. – № 1. – P. 75-78.
61. Recommended Methods for the Testing Heroin. Manual for Use by National Narcotics Laboratories. United Nations, New York Division of Narcotic Drugs. Vienna, ST/NAR7/1986.
62. Recommended Methods for the Testing Cocaine. Manual for Use by National Narcotics Laboratories. United Nations, New York Division of Narcotic Drugs. Vienna, ST/NAR7/1986.
63. Recommended Methods for the Testing Cannabis. Manual for Use by National Narcotics Laboratories. United Nations, New York Division of Narcotic Drugs. Vienna. ST/NAR8/1987.
64. Recommended Methods for the Testing Amphetamine and Methamphetamine. Manual for Use by National Narcotics Laboratories. United Nations, New York Division of Narcotic Drugs. Vienna. ST/NAR9/1987.
65. Recommended Methods for the Testing Opium/Crude Morphine. Manual for Use by National Narcotics Laboratories. United Nations, New York Division of Narcotic Drugs. Vienna. ST/NAR11/1987.
66. Repetto M.R., Repetto M. Habitual, Toxic and Lethal Concentrations of 103 Drugs of Abuse in Humans // *Clin. Toxicol.*, 1997. – V. 35. – № 1. – P. 1-9.
67. Seno Y., Suzuki O., Kunazawa T. Rapid Isolation with SepPak C18 Cartridges and Wide Bore Capillary Column GC of Benzophenones, the Acid Hydrolysis Products of Benzodiazepines // *J. Anal. Toxicol.*, 1991. – V. 15. – P. 21-24.
68. Sioufi A., Dubois J.P. Chromatography of Benzodiazepines // *J. Chrom.*, 1990. – V. 531. – P. 459-480 *Biomed. Appl.*
69. Therapeutic and Toxic Drug Concentrations // *Bulletin of TIAFT*, V. 26. – № 1, supplement.
70. Vrenna L., Ercollini P., Castaldo A.M. etc. Comparison of RIA, PFIA and EMIT methods for the detection of drugs of abuse in urine // *Ital. J. Clin. Chem.*, 1993. – V. 18. – № 1. – P. 41-46.

Приложение 1

Лабораторная диагностика отравлений лекарственными, наркотическими средствами, техническими продуктами

Вещества	Пробоподготовка	Метод анализа	Предел обнаружения мкг/мл	Литература
Барбитураты	Изолирование, концентрирование	ТСХ	10	15, 37
	Изолирование, реэкстракция	УФ-спектрометрия	10	15, 37
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с ДИП	0,1	20
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с NPD	0,6	7
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с ТАД	0,1	7
	Изолирование, перевод в производные	ГЖХ с МСД	0,1	45, 54
	Изолирование, реэкстракция	ВЭЖХ с УФ	0,04	7
	Депротенинизация, прямой ввод	ВЭЖХ с УФ	0,04	20
	Ультрафильтрация, прямой ввод	ВЭЖХ(Bio-RAD)	1,0	6
	Прямой анализ	EMIT Syva	0,001	47
	Прямой анализ	ПФИА Abbot	0,025	7, 8
Бензодиазепины	Изолирование, концентрирование	ТСХ	10	15, 68
	Гидролиз, изолирование	ТСХ	1-5	4, 68
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с ДЭЗ(Ni63)	0,1	27, 68
	Гидролиз, изолирование, концентрирование	ГЖХ с NPD	0,1	7, 68, 67
	Гидролиз, изолирование, концентрирование	ГЖХ с ТАД	0,1	7, 68
	Изолирование перевод в производные	ГЖХ с МСД	0,1	3, 41, 68
	Гидролиз, изолирован. реэкстракция,	ВЭЖХ с УФ	0,1	7
	Ультрафильтрация, прямой ввод	ВЭЖХ(Bio-RAD)	0,01	6, 56
	Прямой анализ	EMIT Syva)	0,001	47
	Прямой анализ	ПФИА Abbot	0,05	70,1
Фенотиазины	Прямой анализ пробы	хим.тест FNP	10,0	43, 29
	Изолирование, концентрирование	ТСХ	10,0	15, 37
	Изолирование, перевод в производные	УФ	10,0	37, 35
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с ДЭЗ(Ni63)	0,1	43
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с ДИП	1-5	19
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с NPD, ТАД	0,1-1,0	7, 43
	Изолирование, перевод в производные	ГЖХ с МСД	0,1	43
	Депротенинизация, прямой ввод	ВЭЖХ с УФ	0,1	43
	Ультрафильтрация, прямой ввод	ВЭЖХ(Bio-RAD)	0,1	23
	Прямой анализ	EMIT Syva)	0,001	7, 47
	Прямой анализ	ПФИА Abbot	0,01	7

Трициклические антидепрессанты	Изолирование, концентрирование	ТСХ	10,0	32, 37
	Изолирование, рекстракция	УФ	10,0	32
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с NPD, ТАД	0,1	7, 43
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с ДИП	1,0	18, 22, 19
	Изолирование, перевод в производные	ГЖХ с МСД	0,1	46, 51, 43
	Депротенинизация, прямой ввод	ВЭЖХ с УФ	0,1	43
	Ультрафильтрация, прямой ввод	ВЭЖХ(Bio-RAD)	0,05	26, 58
	Прямой анализ	ЕМІТ Syva	0,001	58
	Прямой анализ	ПФИА Abbot	0,04	58
Антигистаминные препараты	Изолирование, концентрирование	ТСХ	10,0	15
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с ДИП	1,0	18
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с ТАД	10,0	7
	Изолирование	ГЖХ с NPD	0,6	7
	Депротенинизация, прямой ввод	ГЖХ с МСД	0,1	43, 51
	Ультрафильтрация, прямой ввод	ВЭЖХ с УФ	0,1	43
	Прямой анализ	ВЭЖХ(Bio-RAD)	0,05	6, 21
	Прямой анализ	ЕМІТ Syva)	0,001	47, 43
	Прямой анализ	ПФИА Abbot	0,05	
Адреноблокаторы	Изолирование, концентрирование	ТСХ	10	21
	Изолирование, перевод в производные	ГЖХ с ДЭЗ	0,05	55, 36
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с NPD, ТАД	0,1	7, 43
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с ДИП	1,0	19
	Депротенинизация, прямой ввод	ВЭЖХ с УФ	1,0	36
	Ультрафильтрация, прямой ввод	ВЭЖХ(Bio-RAD)	0,04	6, 57
Карбамазепин	Изолирование, концентрирование	ТСХ	10	15
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с ДИП	1,0	18
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с ТАД	0,01	7
	Изолирование, перевод в производные	ГЖХ с МСД	0,001	43
	Ультрафильтрация, прямой ввод	ВЭЖХ(Bio-RAD)	0,05	6, 21
	Прямой анализ	ЕМІТ Syva	0,001	70
	Прямой анализ	ПФИА Abbot	0,01	70
Лепонекс	Изолирование, концентрирование	ТСХ	10	43
	Изолирование, дериватизация	ГЖХ с ДИП	1,0	43
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с NPD	0,01	7
	Изолирование, дериватизация	ГЖХ с МСД	0,01	43
	Ультрафильтрация, прямой ввод	ВЭЖХ(Bio-RAD)	0,01	6, 21, 30
Сердечные гликозиды	Прямой анализ пробы	ЕМІТ Syva	0,0001	21
		ПФИА Abbot	0,001	21

Опиаты	Гидролиз, изолир., концентрир,	ТСХ	10	7,43,61,65,4
	Гидролиз, изолир., концентрир	ГЖХ с ДИП	1,0	2,44,51,53,6
	Гидролиз, изолир., концентр.	ГЖХ с ТАД,NPD	0,01	1,65,59
	Гидролиз, изолир., дериватизация	ГЖХ с МСД	0,01	6,24,25
	Изолирование, реэкстракция	ВЭЖХ с УФ	0,1	7,47,70
Опиаты	Ультрафильтрация, прямой ввод	ВЭЖХ(Bio-RAD)	0,05	7,70,59
	Прямой анализ	ЕМІТ Syva	0,01	
	Прямой анализ	ПФИА Abbot	0,03	
Каннабиноиды	Смывы с кожи, изолирование	хим.тест		7,14,63
	Гидролиз, изолирование, реэкстракция	ТСХ	10	14,7,63
	Гидролиз, изолирование, концентрирование	ГЖХ с ДИП	0,1	43,63
	Гидролиз, изолирование, дериватизация	ГЖХ с МСД	0,1	63,51,44
	Изолирование, реэкстракция	ВЭЖХ		50,63
	Прямой анализ	ЕМІТ Syva	0,01	47,63,70
	Прямой анализ	ПФИА Abbo	0,1	63,70
	Прямой анализ	РИА Abuscreent	0,001	63,70
Кокаин	Смыв с кожи, изолирование	хим. тест		43,62
	Концентрирование			
	Изолирование, концентрирование	ТСХ	10	43,62
	Изолирование, перевод в производные	ГЖХ с МС	0,01	43,44,62, 51,52
	Изолирование, реэкстракция	ВЭЖХ	0,1	43,62
	Ультрафильтрация, прямой ввод	ВЭЖХ(Bio-RAD)	0,01	57,59,25
	Прямой анализ	ЕМІТ	0,01	47
	Прямой анализ	Abbot	0,01	7,70,62
	Прямой анализ	Abuscreen	0,001	7,70,62
Фенилалкиламины	Изолирование, концентрирование	ТСХ	10	7,43,64,2
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с ДИП	0,1	7,43,64
	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с ТАД,NPD	0,1	7,43,64
	Изолирование, перевод в производные	ГЖХ с МСД	0,01	2,44,48,51 52,64
	Изолирование, реэкстракция	ВЭЖХ с УФ	1,0	7,43,64
	Ультрафильтрация, прямой ввод	ВЭЖХ(Bio-RAD)	0,03	23,25
	Прямой анализ	ЕМІТ Syva	0,001	47,64,7
	Прямой анализ	ПФИА Abbot	0,01	7,70

Спирты Одноатомные (Метанол, Этанол, Пропанол, Изо-пропанол, н-Бутанол, Изо-бутанол), Амиловые спирты	Перевод в алкилнитриты	ГЖХ с катарометром	0,05% по этанолу	4
	Депротеинизация и прямой ввод пробы	ГЖХ с ДИП	0,01% по этанолу	9
	Депротеинизация и прямой ввод пробы	ГЖХ с ДИП	0,1 ммоль/л	49
Многоатомные Этиленгликоль	Перевод в фенилборонатный эфир	ГЖХ с ДИП	1 мкг/мл	60
	Прямой ввод биопробы	ГЖХ с ДИП	100 мкг/мл	9
	Экстракция	ГЖХ с ДИП	100 мкг/мл	1
Промышленные хлорорганические продукты (1,2-Дихлорэтан, трихлорэтилен, Перхлорэтилен, Хлороформ, Этиленхлорид)	Парогазовый анализ	ГЖХ с ДИП	1 мкг/мл	34
	Прямой ввод пробы	ГЖХ с ДИП	5 мкг/мл	9
	Экстракция	ГЖХ с ДЭЗ	0,1 мкг/мл	17
Четыреххлористый углерод	Парогазовый анализ	ГЖХ с ДИП	20 мкг/мл	34
	Изолирование	ГЖХ с ДЭЗ	0,1 мкг/мл	17
Ароматические углеводороды (Бензол, Толуол, Ксилол)	Парогазовый анализ	ГЖХ с ДИП	1 мкг/мл	34
	Прямой ввод пробы	ГЖХ с ДИП	5 мкг/мл	9
Кетоны (Ацетон, Метилэтилкетон)	Парогазовый анализ	ГЖХ с ДИП	1 мкг/мл	34
	Прямой ввод пробы	ГЖХ с ДИП	1 мкг/мл	9

Фосфорорганические соединения (Метафос, Карбофос, Трихлорметафос, Трихлорметафос-3, Хлорофос, ДДВФ, Фоксим)	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с термоионным детектором	0,01 мкг/мл по метафосу	16
Хлорорганические пестициды (Гекса-хлорциклогексан = Линдан, Гептахлоран)	Изолирование, концентрирование	ГЖХ с ДЭЗ	0,001 мкг/мл по линдану	17
Тяжелые металлы (Мышьяк, Медь, Свинец, Кобальт, Таллий, Железо)	Минерализация с концентрированными кислотами	ААС с высокотемпературным пламенем	As=0,4 ppm; Pb=0,1 ppm; Co=0,06 ppm; Tl=0,3 ppm.	31 31
Ртуть	Деструкция Деструкция, образование дитизоната	ААС с генератором гидридных паров	10 мкг/мл	31 13
Метгемоглобинообразователи (Анилиновые красители, Нитрит натрия)	Определение метгемоглобина Образование комплексов с феррицианидом	Фотоколориметрия спектрофотометрия		39

Руденко Б.А., Коваленко А.Е., Галузин К.А., Руденко Г.И.,
Кардонский Д.А., Гришин Д.А., Еганов А.А.

ХИМИКО-АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАРКОТИЧЕСКИХ И ДОПИНГОВЫХ СРЕДСТВ

Учебное пособие

Все права на данное издание принадлежат издательскому дому «Нарконет»
и коллективу авторов.

Воспроизведение и распространение в каком бы то ни было виде
части или целого издания не могут быть осуществлены без разрешения издательства.

Издательство «Нарконет»
117418 Москва, ул. Цюрупы, д. 3
Тел.: (495) 129-55-33
www.id-narkonet.ru

Подписано в печать 21.04.2007. Формат 70x100 1/16
Печать офсетная. Бумага офсетная. Усл. печ. л. 23
Тираж 1500 экз. Заказ № 898

Отпечатано в ОАО «Типография «Новости»
105005, Москва, ул. Фридриха Энгельса, 46

Mozart grüßt
Greetings from Mozart



Mozart Kugeln
in zarter Alpenmilch-Chocolade

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПРИБОРЫ

для определения наркотических,
сильнодействующих веществ и допингов
от мирового лидера

FOCUS DSQ II / TRACE DSQ II

... исключительное соотношение цена/качество



Квадрупольный хромато-масс-спектрометр, оптимизированный для каждодневной работы в аналитической лаборатории для идентификации и количественного анализа наркотических и лекарственных средств с высочайшей чувствительностью, скоростью сканирования и достоверностью идентификации

А так же система ГХ/МС/МС PolarisQ и ГХ/МС высокого разрешения DFS, не имеющие аналогов по аналитической мощности

LXQ™

... высокопроизводительная линейная квадрупольная ионная ловушка

Система ВЭЖХ/МСⁿ с непревзойденной чувствительностью, великолепными характеристиками для современной аналитической лаборатории. Быстрый аналитический цикл и высокая чувствительность позволяет проводить на LXQ точную и надежную идентификацию при скрининге лекарственных и наркотических средств, анаболических стероидов их и метаболитов, в анализе пептидов и белков.



А так же системы ВЭЖХ SpectraSystem, SURVEYOR и ACCELA, ВЭЖХ/МСⁿ TSQ QUANTUM, LTQ XL, LTQ ORBITRAP и LTQ FT ULTRA, не имеющие аналогов по аналитической мощности

Лучшие лаборатории мира выбирают оборудование Thermo Scientific!

Authorized Distributor for Thermo Scientific Brand Products

Thermo
SCIENTIFIC

Москва, ул. Косыгина 19
Тел./факс: 495-9379633, 9958890

E-mail: info@textronica.com
www.textronica.com
www.gcms.ru

ХИМИКО-АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАРКОТИКОВ И ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ

